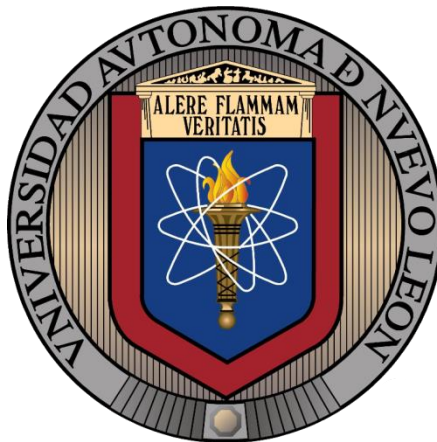


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A
GLICOPÉPTIDOS EN ENTEROCOCOS RECOLECTADOS EN
DOS HOSPITALES DE MÉXICO**

Por

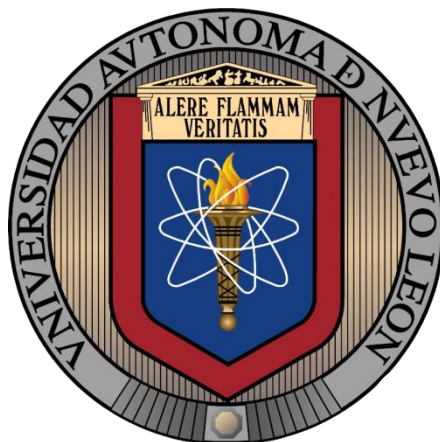
Q.B.P. MARÍA AURORA LUNA DE ALBA

Como requisito parcial para obtener el grado de
**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA**

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

Enero, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO L
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A
GLICOPÉPTIDOS EN ENTEROCOCOS RECOLECTADOS EN
DOS HOSPITALES DE MÉXICO**

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Juan F. Contreras Cordero
Presidente

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Secretario

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dr. José Santos García Alvarado
Vocal

Dra. Paola Bocanegra Ibarias
Vocal

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A
GLICOPÉPTIDOS EN ENTEROCOCOS RECOLECTADOS EN
DOS HOSPITALES DE MÉXICO**

Dirección de tesis

Dr. Juan F. Contreras Cordero
Director

Dra. Paola Bocanegra Ibarias
Directora externa

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA A GLICOPÉPTIDOS EN ENTEROCOCOS RECOLECTADOS EN DOS HOSPITALES DE MÉXICO

Presentado por:

Q.B.P. María Aurora Luna de Alba

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo supervisión del Dr. Juan F. Contreras Cordero. Así como en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” bajo la asesoría de la Dra. Paola Bocanegra Ibarias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que me dio fuerza para creer en mi misma y lograr cosas que me parecían imposibles de realizar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto así como mis estudios de posgrado. Al laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME), del servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” y el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. por permitirme el uso de sus instalaciones.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Biológicas que me permitieron desarrollarme de forma académica y profesional, así como darme la oportunidad de conocer más acerca del hermoso mundo de la ciencia.

Al Dr. Juan F. Contreras Cordero, por permitirme trabajar bajo su tutela, por tener siempre las palabras de ánimo exactas para ese momento de confusión, gracias por todo su apoyo y enseñanzas.

A la Dra. Paola Bocanegra Ibarias, mil gracias por guiarme en este camino de la investigación, por confiar en mí, por brindarme todo su conocimiento y sobre todo ser tan paciente conmigo. Muchísimas gracias, por que de alguna manera sus enseñanzas forman parte de lo que ahora soy.

A mi hermosa familia, mi papá, mi mamá y mi hermana, sin ellos no sería nada de lo que soy ahora.

A mi papá y mi mamá, gracias por todas sus enseñanzas, por dar tanto de sí para mi bienestar, por apoyarme en todas mis locuras y por darme todo ese hermoso amor, por enseñarme que las adversidades pasan más rápido si permanecemos unidos, y que no hay nada más importante que la familia.

A mi mamá por ser una gran mujer en mi vida y darme el ejemplo de cómo se debe de seguir adelante ante las adversidades, no dejarse derrotar nunca y ver siempre hacia adelante, por estar ahí en mis momentos felices así como en los más oscuros, ¡te amo!.

A mi hermana, por ser una segunda mamá, gracias por los regaños, consejos, y por apoyarme siempre por más loca que sea la situación, ¡te amo aunque siempre me regañes!.

Agradezco especialmente a mi papá, que a pesar de que ya no esta físicamente conmigo, se que donde quiera que esté esta velando por mi felicidad, tal y como lo hizo en vida, espero que este orgulloso de mi tal y como yo lo estoy de ser su hija, ¡te amo infinitamente!

A mis compañeros de laboratorio, por haber hecho muy agradable mi estancia.

A mis amigos, por estar ahí en los días buenos y no tan buenos, escucharme y aconsejarme.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algnas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estos agradecimientos quiero darles las gracias por formar parte de mi.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme fe y esperanza en los momentos en los que ninguna luz iluminaba el camino.

A mi familia, por ser el pilar más grande en mi vida.

Mi mamá, por cuidarme y nunca soltar mi mano, estar cuando nadie más estuvo y permanecer ahí velando por mi tranquilidad.

Mi papá, por todo el amor que me brindó en vida, por ser un ejemplo a seguir. Le agradezco infinitamente a Dios el haberme permitido tener un papá como él.

Mi hermana, por siempre estar conmigo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Taxonomía de <i>Enterococcus spp</i>	2
2.2 Aspectos históricos del género <i>Enterococcus</i>	2
2.3 Características microbiológicas del género <i>Enterococcus</i>	3
2.4 Hábitat del género <i>Enterococcus</i>	4
2.5 Importancia clínica del género <i>Enterococcus</i>	5
2.5.1 Endocarditis infectiva.....	5
2.5.2 Infecciones en tracto urinario.....	6
2.5.3 Bacteriemia.....	6
2.5.4 Infección gastrointestinal y colitis.....	7
2.5.5 Infección intra- abdominal, pélvica y de tejidos blandos.....	8
2.5.6 Infecciones poco comunes.....	8
2.6 Factores de virulencia de <i>Enterococcus spp</i>	9
2.6.1 Formación de biopelículas.....	9
2.7 Epidemiología del género <i>Enterococcus</i>	9
2.8 Glicopéptidos.....	10
2.9 Farmacorresistencia en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i>	11
2.9.1 Mecanismo de farmacorresistencia.....	12
2.9.2 Genes asociados a farmacorresistencia.....	13
2.10 Enterococos resistentes a vancomicina (ERV).....	15
2.10.1 Fuentes de infección de ERV.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	19

4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL	21
5.1 Objetivos específicos.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Estrategia general.....	22
6.2 Aislamientos clínicos.....	22
6.3 Identificación de aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp.....	23
6.3.2 Selección de aislamientos resistentes a vancomicina.....	24
6.4 Detección genotípica de resistencia a vancomicina.....	24
6.5 Perfil de susceptibilidad a antibióticos.....	25
6.5.1 Preparación del inóculo.....	26
6.5.2 Preparación de las placas.....	26
6.6 Identificación y localización de genes asociados a farmacorresistencia.....	28
6.6.1 Extracción de ADN genómico.....	28
6.6.2 Extracción de ADN plasmídico.....	29
6.7 Determinación del patrón electroforético de los plásmidos.....	30
6.7.1 Extracción de ADN plasmídico.....	30
6.7.2 Patrón electroforético.....	30
6.8 Ensayos de conjugación.....	31
6.8.1 Selección de cepas receptoras y concentración de antibióticos.....	31
6.8.2 Método de apareamiento en fase líquida.....	31
6.8.3 Método de apareamiento en fase sólida acoplado a filtro.....	31
6.8.4 Análisis fenotípico de colonias presuntivamente transconjugantes.....	32
6.8.5 Análisis genotípico de colonias presuntivamente transconjugantes.....	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Identificación de aislamientos de <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a vancomicina...	33
7.2 Perfil de susceptibilidad.....	33
7.3 Identificación de genes asociados a resistencia a glicopéptidos y su localización.	34
7.4 Determinación del perfil plasmídico.....	35
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES.....	43
10. PERSPECTIVAS	44

10. BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXO I: RECOPIACIÓN DE RESULTADOS POR AISLAMIENTO	60
ANEXO II: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES	64

ÍNDICE DE TABLAS

1. Genes asociados a farmacorresistencia en <i>Enterococcus</i> spp.	15
2. Iniciadores empleados para la amplificación de los genes <i>vanA</i> y <i>vanB</i>	25
3. Puntos de corte para los antibióticos analizados	28
4. Susceptibilidad a distintos antibióticos.....	34
5. Concentración mínima inhibitoria para vancomicina en colonias presuntivamente transconjugantes de <i>S. haemolyticus</i>	38

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Mecanismo de resistencia a vancomicina	13
2. Esquema de estrategia general de trabajo.	22
3. Esquema de distribución de los antibióticos y concentraciones empleadas en placa de microtitulación.....	27
4. Gel de agarosa con productos de la detección molecular del gen <i>vanA</i> en ADN total	35
4. Gel de agarosa con diferentes perfiles plasmídicos	36
5. Perfil plasmídico de aislamientos receptores.....	37

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
g	Gramos
h	Horas
kb	Kilobases
L	Litros
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
UV	Ultravioleta
v	Voltios
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

Vancomicina y Teicoplanina son antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones por *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. La resistencia a glicopéptidos es debida al acarreamiento de los operones *vanA* y *vanB*, ambos operones pueden ser transferidos por plásmidos conugativos. La importancia de este estudio fue caracterizar el mecanismo de resistencia a glicopéptidos en aislamientos clínicos de *Enterococcus* spp. Obtenidos en un periodo de 6 años en dos hospitales de México.

Se obtuvieron 560 aislamientos clínicos de *E. faecium* (n=79) y *E. faecalis* (n= 427) durante el periodo 2011 a 2017 de los estados de Nuevo León y Jalisco, México. Los aislamientos fueron identificados por MALDI-TOF MS. La susceptibilidad a antimicrobianos fue determinada por el método de microdilución en caldo de acuerdo a las recomendaciones del CLSI. Los genes *vanA* y *vanB* fueron determinados por PCR en plásmido y cromosoma. El perfil plasmídico fue obtenido por hidrólisis alcalina, y la transferencia horizontal de la resistencia a vancomicina fue realizada por ensayos de conjugación en fase sólida y líquida utilizando a *Staphylococcus haemolyticus* y *E. faecalis* como cepas receptoras.

La resistencia a vancomicina fue del 16% y fue más frecuente en *E. faecium* (96.6%) que en *E. faecalis* (3.4%). Las tasas de resistencia fueron del 100% para vancomicina y ciprofloxacino, 98.8% para teicoplanina y levofloxacino, 97.7% para penicilina y ampicilina y 6.6% para daptomicina. Ninguno de los aislamientos fue resistente a linezolid. El gen *vanA* fue detectado en todos los aislamientos, mientras que el gen *vanB* no se detectó. El gen *vanA* se encontró integrado de forma simultánea en plásmido y cromosoma en un 58.8% de los aislamientos. Se obtuvieron 41 perfiles plasmídicos, con tallas moleculares de 0.3 a 234 kb. No se llevo a cabo conjugación bacteriana en ninguno de los aislamientos que acarreaban el gen *vanA*.

Se identificaron 41 perfiles plasmídicos. La conjugación bacteriana no se llevo a cabo, lo cual sugiere que la diseminación de enterococos resistentes a vancomicina pudo darse por el fenómeno de expansión clonal.

ABSTRACT

Vancomycin and teicoplanin are used in the treatment of infections by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Glycopeptide resistance is due to the carriage of *vanA* or *vanB* clusters, both operons can be transferred by conjugative plasmids. The aim of this study was to characterize the mechanism of glycopeptide resistance in clinical isolates of *Enterococcus* spp. obtained in a 6 year from two hospitals in Mexico.

Five hundred and sixty clinical isolates of *Enterococcus faecium* (n=79) and *Enterococcus faecalis* (n=427) from 2011 to 2017 were obtained from Nuevo Leon and Jalisco in Mexico. Isolates were identified by MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibility was determined by the broth dilution method according to the CLSI. *vanA* and *vanB* genes were determined by PCR in both plasmids and chromosome. The plasmid profile was obtained by alkaline hydrolysis, and the horizontal transfer of vancomycin resistance was performed by liquid and solid-phase mating using *Staphylococcus haemolyticus* and *E. faecalis* as recipient strains.

Resistance to vancomycin was 16%, which was more frequent in *E. faecium* (96.6%) than *E. faecalis* (3.4%). Resistance rates were for 100% for vancomycin and ciprofloxacin, 98.8% for teicoplanin and levofloxacin, 97.7% for penicillin and ampicillin and 6.6% for daptomycin. None of the isolates was resistant to linezolid. *vanA* gene was detected in all the isolates, whereas the *vanB* gene was not detected. *vanA* gene was identified integrated into both chromosome and plasmids in 58.8% of the isolates. Forty-one plasmid profiles were obtained, with plasmids with sizes of 0.3 kb to 234 kb. The conjugation was unsuccessful in all the isolates that harbored *vanA* gene.

Forty-one different plasmid profiles were identified. The conjugation was unsuccessful in all the isolates, which suggest that the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in the Mexican hospital could be by clonal expansion.

1. INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Enterococcus* están asociados con diversas manifestaciones clínicas, incluyendo bacteriemia, endocarditis infecciosa, infecciones en área intrabdominal y pélvica, infecciones en tracto urinario y, en casos raros, infecciones en sistema nervioso central (Sievert *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014).

Las infecciones ocasionadas por enterococos resistentes a vancomicina (EVR) están asociadas a una mayor tasa de mortalidad, aumentando 2.5 veces la mortalidad en los pacientes que sufren de bacteriemia a por EVR (Diaz *et al.* 2005). La resistencia a vancomicina por parte de las especies del género *Enterococcus* ido en aumentando desde que se encontró por primera vez en 1986 (Leclercq *et al.* 1988; Frieden *et al.* 1993) siendo *Enterococcus faecium* la principal causa de infección por enterococos multirresistentes en Estados Unidos. El tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo puede ser difícil y la magnitud del problema es enorme (Hidron *et al.* 2008).

Actualmente, el 30% de las especies de *Enterococcus* que se aíslan en Estados Unidos son resistentes a vancomicina y las infecciones causadas por este microorganismo causan un estimado de 1300 muertes cada año (O'Driscoll y Crank 2015). En un informe de National Healthcare Safety Network descubrieron que aproximadamente el 40% de las infecciones en pacientes localizados en unidades de cuidados intensivos se debían a *E. faecium* resistente a vancomicina (Hidron *et al.* 2008).

La resistencia a glicopéptidos por parte de este microorganismo puede estar codificada cromosómicamente o extracromosómicamente en plásmidos, a menudo estos genes se encuentran dentro de transposones, los cuales sirven como un depósito para la transmisión de resistencia a antibióticos a otros microorganismos (Leavis *et al.* 2007).

La importancia de EVR como patógeno intrahospitalario se debe a que es colonizador natural del tracto gastrointestinal, su persistencia en entornos hospitalarios, la plasticidad de su genoma y a que cuenta con elementos genéticos móviles (Zirakzadeh y Patel 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía de *Enterococcus spp.*

Reino: *Bacteria*

Subreino: *Posibacteria*

Phylum: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Lactobacillales*

Familia: *Enterococcaceae*

Género: *Enterococcus*

2.2 Aspectos históricos del género *Enterococcus*

El término “Enterococcus” probablemente se originó con el descubrimiento del primer organismo de este grupo; Thiercelin (Kuhnen *et al.* 1987) utilizó el término para describir a las bacterias observadas en pares y cadenas cortas en heces humanas. MacCallum y Hastings (MacCallum y Hastings 1899) describieron un caso de endocarditis aguda causada por una bacteria “muy dura y tenaz de vida”, que fue denominada *Micrococcus zymogenes*. Estos autores también mencionaron que un micrococus similar había sido aislado de un pozo, un año antes por otros colegas. Algunos años después, Gordon (Gordon 1905) reportó el aislamiento de estreptococos fecales en un caldo expuesto al aire probablemente contaminado con heces animales, así mismo noto la abundancia de estreptococos en las aguas residuales, proponiendo que podrían ser útiles detectando contaminación fecal humana. En 1906, Andrews y Horder (Andrews y Horder 1906) utilizaron el nombre *Streptococcus faecalis* para identificar un organismo de origen fecal que coagulaba la leche, el manitol y la lactosa, pero no la rafinosa. Orla Jensen (Orla-Jensen 1919) describió un segundo organismo en este grupo, *Streptococcus faecium*, el cual difería principalmente de *S. faecalis* en el agrupamiento celular, en varias características fenotípicas y principalmente en su patrón de sensibilidad, el cual es completamente diferente del observado para el resto del género.

Una tercera especie, *Streptococcus durans*, propuesta por Sherman y Wing (Sherman y Wing 1935), era similar a *S. faecium*, pero tenía menor actividad fermentadora. Sherman (Sherman 1937) utilizó el término “grupo enterocócico” e incluyó a todas las especies de enterococcus conocidas para ese tiempo. En 1967, Nowlan y Deibel (Nowlan y Deibel 1967) añadieron *Streptococcus avium* al grupo enterocócico. En 1970, Kalina propuso que se estableciera un género para los estreptococos enterocócicos y sugirió que, según la disposición celular y las características fenotípicas, *S. faecalis* y *S. faecium* y la subespecie de estos dos taxones se denominaran *Enterococcus* (Kalina 1970). No se tomó ninguna acción sobre esta propuesta y continuó el uso del nombre de género *Streptococcus*. Schleifer y Kilpper-Balz (Schleifer y Kilpper 1984) proporcionaron pruebas genéticas de que *S. faecalis* y *S. faecium* eran suficientemente diferentes de los otros miembros del género para merecer un género separado. Desde entonces se ha aceptado generalmente que el género *Enterococcus* es válido.

Hasta el momento, 17 especies forman parte del género *Enterococcus* (Facklan y Sahm 1995).

2.3 Características microbiológicas del género *Enterococcus*

Los microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* son cocos Gram-positivos de un tamaño de 0.6-2.5 μm , se presentan en forma de pares o cadenas cortas, son inmóviles, no forman esporas, son anaerobios facultativos que forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales; aunque pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en saliva.

En agar sangre, las colonias de los microorganismos pertenecientes a este género muestran una coloración grisácea o algunas veces son incoloras y tienen un diámetro de 2-3 mm (O’Leary 1990). Así mismo, pueden presentar hemólisis de tipo α , β o γ (Bergey y Holt 1994; Koneman *et al.* 1997). Una misma cepa puede variar en sus propiedades hemolíticas dependiendo del ser vivo del cual provenga la sangre empleada en el medio de cultivo (Koneman *et al.* 1997).

Son nutricionalmente complejos ya que fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de ácido láctico, más no de gas, produciendo un pH final de 4.2 a 4.6. Crecen a una temperatura de entre 10 a 45°C, más su crecimiento óptimo se obtiene a una temperatura de 37°C a un pH de 9.6 con 6.5% de NaCl y con 40% de bilis. Portan el antígeno D del grupo Lancefeild y poseen el carbohidrato C. Sobreviven después del calentamiento a 60°C durante 30 minutos (Quiñones *et al.* 2008; Hancock y Gilmore 1998).

Todas las especies de *Enterococcus* son capaces de crecer en presencia de bilis al 40% e hidrolizar la esculina, al igual que las especies del género *Streptococcus* del grupo D, pero se diferencian de estos últimos porque muestran una respuesta positiva a la prueba de PYR (L-pirrolindonil- β -naltil-amida) (Koneman *et al.* 1997). Todas las cepas de *Enterococcus* producen leucino-aminopeptidasa (LAP), por lo que son positivas para esta prueba (Porte *et al.* 2007).

2.4 Hábitat del género *Enterococcus*

Las especies pertenecientes a este género son ubicuas, presentes en productos lácteos y alimentos fermentados, ambientes naturales (cuerpos de agua, suelo, vegetación acuática y terrestre), tracto gastrointestinal de humanos, otros mamíferos, reptiles e insectos. Esta extensa distribución es debida a su habilidad para sobrevivir y persistir en un amplio rango de ambientes, que pueden variar desde su pH, temperatura y condiciones hiper- e hipotónicas (Lebreton *et al.* 2014).

De todas las especies de *Enterococcus*, las 2 especies más frecuentes en el tracto gastrointestinal humano son *E. faecalis* y *E. faecium*, colonizando el colon en un promedio de 10^7 UFC μg^{-1} (Chenoweth y Schaberg 1990). En promedio, se ha encontrado a *E. faecalis* en heces humanas en un rango de 10^5 a 10^7 por gramo, mientras que *E. faecium* de 10^4 a 10^5 por gramo (Franz *et al.* 1999).

2.5 Importancia clínica del género *Enterococcus*

Estos microorganismos pueden causar una gran variedad de infecciones y en algunas de ellas otros microorganismos son frecuentemente aislados en el mismo sitio.

Algunas de las infecciones que comúnmente causa son: endocarditis, infecciones en tracto urinario, bacteriemias, infecciones en tejido intra-abdominal, pélvico y tejido suave.

2.5.1 Endocarditis infectiva

La endocarditis es una condición en el corazón caracterizada por el daño en el endotelio vascular causado por un alto flujo en la presión sanguínea a través de aberturas estrechas en las que predomina la baja presión sanguínea, causando la formación de plaquetas de fibrina (vegetaciones); las vegetaciones sirven como sustrato para la adhesión y posterior formación de biopelículas por parte del microorganismo (Cabell *et al.* 2003).

Frecuentemente se presenta en individuos con condiciones cardíacas preexistentes (Rasmussen *et al.* 2013). Otros factores de riesgo para contraer una endocarditis infectiva es el uso de implantes médicos, como lo son: válvulas cardíacas artificiales, marcapasos o implantes de desfibriladores (Cabell *et al.* 2003). Este tipo de infección raramente ocurre en individuos sanos (Rasmussen 2013).

De las especies de enterococos *E. faecalis* permanece como la causa más común de endocarditis infectiva sobre *E. faecium*.

Enterococcus es la tercera causa de endocarditis infectiva en Norte América y la cuarta a nivel mundial (Murdoch *et al.* 2009). La endocarditis causada por enterococos tiene una incidencia de 5 al 15% de todos los casos de endocarditis en Estados Unidos y esta tasa no ha cambiado sustancialmente a lo largo de las décadas (Murdoch *et al.* 2009).

La endocarditis es una de las infecciones enterococales más serias, debido a la resistencia intrínseca que poseen estos microorganismos a la mayoría de los antibióticos, es por esto que su tratamiento es difícil.

2.5.2 Infecciones en tracto urinario

Las infecciones enterocococicas están mayoritariamente relacionadas con el uso de artefactos en este tipo de vías por tiempo indefinido.

Las infecciones en tracto urinario inferior (como cistitis, prostatitis o epididimitis) son frecuentemente observadas en hombres de edad avanzada. Es extremadamente raro observar cistitis causada por enterococos en mujeres jóvenes. En cambio, las infecciones en tracto urinario superior se observan con mayor frecuencia en hombres de edad avanzada y estas comúnmente pueden desencadenar una bacteriemia (Graninger y Ragette 1992).

En unidades de cuidados intensivos, los enterococos causan hasta un 15% de infecciones en tracto urinario asociadas a ambientes intrahospitalarios (Hidron *et al.* 2008).

2.5.3 Bacteriemia

Enterococcus tiene el segundo lugar de microorganismos causantes de bacteriemia asociada a centros de salud (Hidron *et al.* 2008). El 45 % de las infecciones de torrente sanguíneo causadas por Gram positivos están relacionadas con especies del género *Enterococcus* (Silva *et al.* 2005). Las bacteriemias usualmente se originan por infecciones mal tratadas en el tracto genitourinario, vías biliares, zona intra-abdominal o tejidos suaves.

Los enterococos se encuentran como componentes de bacteriemias polimicrobianas más frecuentemente que otros microorganismos (Maki y Agger 1988; Patterson *et al.* 1995).

Las bacteriemias ocasionadas por enterococos, en contraste con las relacionadas a otros microorganismos Gram positivos, raramente se originan en órganos distantes o causan abscesos metastásicos, además de ser las únicas causadas por microorganismos Gram-positivos que presentan un alto riesgo de muerte (Weinstein *et al.* 1983). El mayor daño con el que se trata cuando se tiene una bacteriemia es la presencia de una endocarditis.

Sin embargo, incluso cuando la fuente específica de infección es identificada, las tasas de mortalidad de las bacteriemias por enterococos están entre el 26 y 46% (Maki y Agger 1988; Malone *et al.* 1986).

Algunos estudios han demostrado que la bacteriemia asociada con *E. faecium* tiene mayores tasas de mortalidad que por *E. faecalis* (Noskin *et al.* 1995). Pacientes con enfermedades fatales tienen tasas de mortalidad de hasta un 75%, estas altas tasas corresponden a pacientes de edad avanzada con múltiples enfermedades, como lo son diabetes mellitus, enfermedades del corazón, trasplantes, tumores malignos o cirugías previas (Nelson *et al.* 2014).

Las bacteriemias son la décima causa de muerte en Estados Unidos. Su incidencia va de 1% en pacientes de unidades de cuidados intensivos a 36% en pacientes con trasplante de médula ósea (Collin *et al.* 2001).

2.5.4 Infección gastrointestinal y colitis

La microbiota del tracto gastrointestinal consiste en un consorcio de especies bacterianas que incluyen *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Bacteroides* sp. y *Clostridium* sp., las cuales juegan un papel importante en la prevención de la infección mediante la resistencia a la colonización, y las irregularidades en este consorcio está asociado con enfermedades como los son cáncer, obesidad, desnutrición, diabetes y la enfermedad inflamatoria intestinal (Guinane y Cotter 2013). Modificaciones en la dieta, estatus de salud y consumo de medicamentos son factores que influyen la composición de la microbiota intestinal (Guinane y Cotter 2013).

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) puede resultar de (i) una respuesta aberrante del sistema inmune a partir de la mucosa hacia los comensales en el intestino, (ii) disbiosis, (iii) alteración de la función de la barrera intestinal o en combinación con una disbiosis (Strober *et al.* 2007). En estas situaciones, los enterococos pueden tener una transición a patógeno oportunista causando EII crónica después de causar una infección aguda por *E. faecalis* (Ocvirk *et al.* 2015)

En centros hospitalarios, los pacientes precolonizados con enterococos resistentes a antibióticos pueden experimentar sobre crecimiento de los mismos después de una infección inducida por el suministro de antibióticos, derivándose una alteración en la microbiota intestinal dando lugar a la translocación de enterococos resistentes a antibióticos de

microbiota intestinal hacia el torrente sanguíneo. En individuos sanos, las bacterias residentes del tracto gastrointestinal estimulan la secreción de RegIII γ , secreción de lecitina del tipo C por el epitelio intestinal y células Paneth, lo cual es importante para la eliminación de bacterias Gram-positivas, por medio de la vía de señalamiento (Brand *et al.* 2007; Cash *et al.* 2006)

2.5.5 Infección intra- abdominal, pélvica y de tejidos blandos

Los enterococos son normalmente recuperados de cultivos provenientes de infecciones de muestras intra-abdominales, pélvicas y tejidos suaves. Normalmente son aislados como componentes de una mezcla de microbiota polimicrobiana y raramente causan infecciones monomicrobianas en estos sitios (Graninger y Ragette 1992).

La peritonitis, una infección del revestimiento abdominal, ocurre frecuentemente en conjunto con cirrosis hepática o en pacientes que reciben diálisis. La infección puede progresar en tres estados: i) Peritonitis primaria: la bacteria se propaga por vía hematógena y comúnmente afecta a individuos inmunocomprometidos; (ii) Infección secundaria: la bacteria se propaga vía daño visceral a algún órgano, lo cual puede ser post operatorio (por ejemplo, una perforación, trauma, complicación post operatoria, etc); (iii) peritonitis terciaria: es definida como persistente o infección intra-abdominal recurrente. Esta infección puede ser mono- o polimicrobiana (en conjunto con *E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa-negativa y *Staphylococcus aureus*) y puede conducir a infección en torrente sanguíneo, disfunción orgánica, o en casos muy serios, la muerte (Higueta y Huycke 2014).

2.5.6 Infecciones poco comunes.

Otras infecciones poco comunes o raramente observadas causadas por enterococos, incluyen meningitis, osteomielitis hematógena, artritis séptica y neumonía. Esta última es bastante rara, incluso cuando se está asociada con ventiladores, y solo ha sido documentada en pacientes severamente debilitados o inmunocomprometidos que reciben antibióticos de amplio espectro (Nelson *et al.* 2014).

2.6 Factores de virulencia de *Enterococcus* spp.

La patogénesis de las especies de enterococos en infecciones oportunistas es alcanzada por la producción de factores de virulencia y su resistencia a antimicrobianos. Estos factores de virulencia están envueltos en el ataque a células hospederas o proteínas de matriz extracelular, así como en la evasión del sistema inmune. La ausencia de estos factores de virulencia atenuaría la infección. La mayoría de los factores de virulencia han sido descritos en *E. faecalis*, mientras que solo un número limitado de genes han sido descritos experimentalmente en *E. faecium* (Garsin *et al.* 2014).

2.6.1 Formación de biopelículas

La habilidad de los enterococos de producir biopelículas es una de las causas fundamentales de infecciones endodónticas y de tracto urinario. La formación de pili por el enterococos es necesaria para la formación de biopelículas, este pili es heterotrimérico y contiene dos pilis menores. El gen asociado a su formación es *ebp* (endocarditis and biofilm associated pili). El operon *ebp* consiste en *ebpA*, *ebpB* y *ebpC*, y está asociado con *srtC* (codifica una sortasa C) (Singh *et al.* 2007). Un mutante de *E. faecalis* incapaz de producir pili es incapaz de producir biopelículas (Budzik y Schneewind 2006).

2.7 Epidemiología del género *Enterococcus*

Entre los años 2006 y 2007 en Estados Unidos, *Enterococcus* causó el 40% de las infecciones asociadas al uso de catéteres en unidades de cuidados intensivos (UCI), incluyendo bacteriemia asociada a catéter central, infección urinaria asociada a cirugía y neumonía asociada a ventilación mecánica (Weiner *et al.* 2016).

Se ha reportado que *E. faecalis* es responsable del 80-90% de las infecciones nosocomiales asociadas a Enterococos, seguido de *E. faecium* 10-15% (Jett 1994). La predominancia de *E. faecalis* en los aislamientos clínicos se debe a su abundancia natural en el tracto gastrointestinal, donde *E. faecalis* es aproximadamente 100 veces más predominante que *E. faecium*. Sin embargo, durante los últimos 20 años, se ha observado un cambio

epidemiológico en la incidencia de *E. faecium* en hospitales de Estados Unidos y Europa, donde *E. faecium* ha incrementado notablemente su prevalencia. La razón por la cual ocurrió la sustitución ecológica de *E. faecalis* con *E. faecium* aún se desconoce, pero se ha especulado que puede ser al uso intensivo de antibióticos en los hospitales (Hidron *et al.* 2008). Frecuentemente, el 80% y 90% de las infecciones intrahospitalarias por *E. faecium* son resistentes a ampicilina y vancomicina, respectivamente, mientras que *E. faecalis* aún sigue siendo susceptible a ambos antibióticos (Hidron *et al.* 2008).

En huéspedes susceptibles, *E. faecium* puede causar infecciones oportunistas, siendo el segundo patógeno nosocomial causante de más del 14% de todas las infecciones adquiridas en hospital en los Estados Unidos entre los años 2011 y 2014 (Weiner *et al.* 2016).

2.8 Glicopéptidos

Los glicopéptidos son antibióticos constituidos por moléculas complejas, las cuales son sintetizadas por gran variedad de especies bacterianas, incluyendo *Actinoplanes* y *Streptomyces* (Wilhelm y Estres 1999).

Son compuestos de peso molecular muy elevado y su estructura central es un heptapéptido. Los compuestos pertenecientes a este grupo se diferencian en los aminoácidos situados en posición 1 y 3 y en algunos de los sustituyentes laterales de los residuos aromáticos (Glew y Keroack 1998).

Actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, presentando un espectro de actividad restringido a bacterias Gram positivas aerobias y anaerobias, actuando solamente sobre microorganismos en crecimiento activo. Los glucopéptidos se unen al terminal D-Alanil-D-Alanina del pentapéptido precursor del peptidoglicano mediante cinco puentes de hidrógeno. Secundariamente, inhiben el crecimiento celular, alteran la permeabilidad celular y la síntesis de ARN (Glew y Keroack 1998).

En las dos últimas décadas han adquirido una mayor importancia en el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos Gram positivos multirresistentes. La

vancomicina y la teicoplanina son los únicos antibióticos de este grupo actualmente disponibles; otros glucopéptidos en estudio son la decaplanina, oritavancina, MDL 62208, MDL 62211, MDL 62879 y Bi 397 (Lundstrom y Sobel 2000).

La vancomicina, producida por *Streptomyces orientalis*, se introdujo en el mercado en 1958. Sin embargo, debido a su toxicidad y a la aparición de penicilinas resistentes a las penicilinasas, se utilizó poco. Posteriormente, el considerable aumento de la resistencia a la meticilina de *S. aureus* y a los betalactámicos en otros Gram positivos, así como la obtención de preparados más purificados con la consiguiente disminución de efectos indeseables, han hecho que su utilización haya aumentado (Lundstrom y Sobel 2000).

La teicoplanina, producida por *Actynoplanes teichomycetus*, en un principio se denominó teicomina A2 y presenta una estructura semejante a la de la vancomicina. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared bacteriana, impidiendo la polimerización del peptidoglicano de la pared celular (Parenti 1986).

2.9 Farmacorresistencia en *E. faecium* y *E. faecalis*

La farmacorresistencia ha ido aumentando a lo largo de los años. La vancomicina fue el primer antibiótico utilizado en la clínica en 1972 y el primer enterococo aislado resistente a vancomicina se identificó 15 años después. Las tasas de resistencia de las especies de *Enterococcus* han alcanzado proporciones endémicas o epidémicas en Norte América, mientras que en Europa han sido niveles bajos pero que se mantienen en incremento (Mutnick *et al.*, 2003).

El NNIS (National nosocomial infections surveillance system) reportó un incremento de 7.6% de Enterococos Resistentes a Vancomicina (VRE) entre los años 1989 y 1993 (Metan *et al.* 2005). Se ha reportado que, si el paciente resulta infectado con un enterococo resistente a glicopéptidos, el tratamiento clínico fallará, incrementando la mortalidad de 27% a 52% (Brown *et al.*, 2006).

En ambas bases de datos, SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance) y SENTRY (Antimicrobial Resistance Surveillance Program), se reporta que de los aislamientos de enterococos obtenidos de torrente sanguíneo, el 2% de *E. faecalis* y 60% de *E. faecium*, son resistentes a vancomicina (Bearman y Wenzel 2005).

La resistencia por parte de enterococos no es exclusivo del ambiente intrahospitalario, sino que también es prevalente en la industria alimentaria. La presencia de EVR en individuos que acaban de ser hospitalizados, sin tener un tratamiento previo con antibióticos, sugiere que EVR probablemente fue adquirido a través de un alimento contaminado. (Mannu *et al.* 2003).

2.9.1 Mecanismo de farmacoresistencia

La resistencia a glicopéptidos involucra un sistema de dos componentes donde la composición de la pared celular es alterada, donde el precursor del peptidoglicano D-Ala-D-Ala (susceptible a vancomicina) es modificado a D-Ala-D-Lactato (D-Lac). Esta última tiene una afinidad 1000 veces menor con la vancomicina, mientras que la D-Ala-D-Ser tiene una disminución de siete veces en la afinidad por la vancomicina, eliminando así el blanco susceptible de la bacteria (Gilmore 2002).

Los genes que están envueltos en este sistema de dos componentes son *vanS* / *vanR*. La quinasa sensora VanS es activada en respuesta a la vancomicina, resultando la activación de los precursores de peptidoglicano D-Lac o D-Ser y la represión de D-Ala-D-Ala (Figura 1) (Stephenson y Hoch 2002).

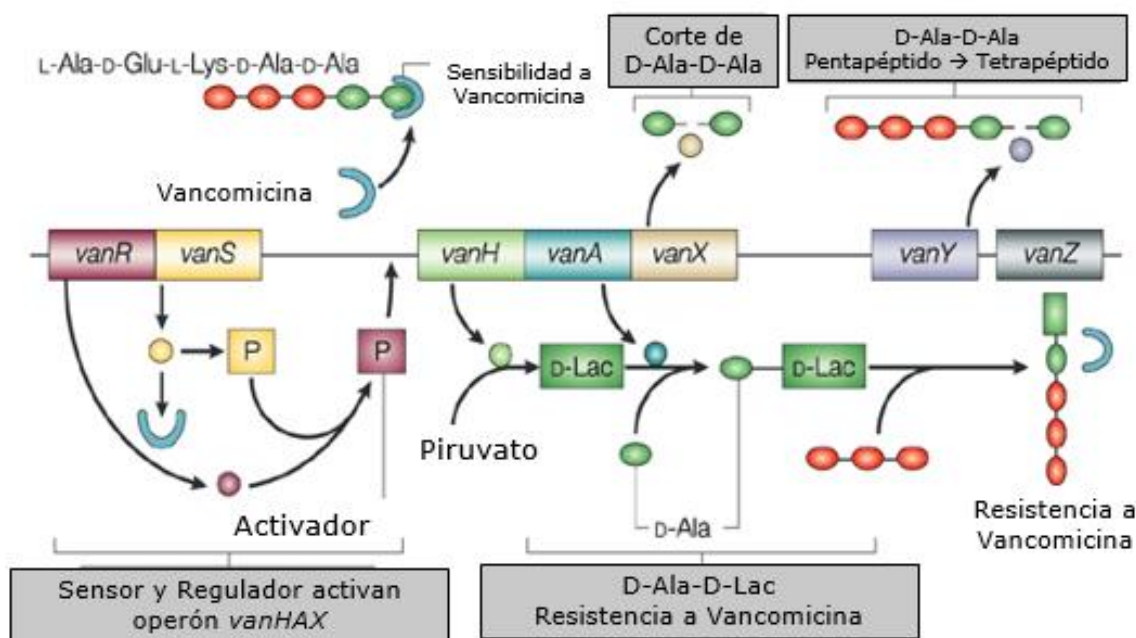


Figura 1. Mecanismo de resistencia a vancomicina.

2.9.2 Genes asociados a farmacorresistencia

Hasta la fecha, seis clusters de genes asociados a la resistencia a los glicopéptidos han sido identificados en especies de *Enterococcus*: *vanA-vanG*.

Los tres tipos de resistencia principales son codificados por los clusters *vanA*, *vanB* y *vanC* (Tabla 1) predominando mundialmente *vanA* (Hegstad *et al.* 2010).

El operón de *vanA* involucra 7 genes: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR*, *vanS*, *vanY* y *vanZ*; este operón es adquirido a través del transposón Tn1546 (Gilmore 2002). Más de 100 aislamientos de enterococos provenientes de humanos, animales y alimentos han mostrado portar el gen de resistencia *vanA* en el transposón Tn1546 (Williams y Hergenrother 2008). Este genotipo se asocia a una resistencia adquirida e inducible hacia los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina en un alto nivel y siendo este genotipo el predominante en las variantes de ERV a nivel mundial (O'Driscoll y Crank 2015). La resistencia es mediada por la sustitución del péptido terminal D-Ala-D-Ala con D-Ala-D-Lac. Las cepas que expresan *vanA* también son resistentes al glicopéptido teicoplanina debido a la presencia de un gen

adicional presente en el operón de *vanA*, *vanZ*, que confiere resistencia por un mecanismo aún desconocido (Arthur *et al.* 1995).

El gen *vanB* confiere una resistencia variada a la vancomicina, variando de moderada a alta (MIC 4-256 µg/mL) y susceptibilidad a la teicoplanina (O'Driscoll y Crank 2015). Al igual que *vanA*, la resistencia de *vanB* está mediada por la conversión de D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac, sin embargo, el mecanismo para una resistencia inferior en comparación de *vanA* no está bien definido, pero es probable que sea resultado de una proporción menor de sustitución de D-Ala-D-Lac en la pared celular de las cepas que portan *vanB*. La resistencia a la vancomicina es proporcional al porcentaje de composición de D-Ala-D-Lac a D-Ala-D-Ala (Arthur *et al.* 1996). Los aislamientos que portan este gen tienen menor prevalencia que los que portan el gen *vanA*.

La transferencia del gen de resistencia *vanB* (adquirido) ocurre a través del intercambio con el transposón Tn1547 y/o Tn5382. Ambos genes, *vanA* y *vanB* son transferidos por medio de plásmidos conjugativos mediados por feromonas o transposones. Estos genes de resistencia pueden ser transferidos no únicamente a enterococos susceptibles a antibióticos, sino que también a otros patógenos (Giraffa 2002).

La resistencia por *vanC* es intrínseca en *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, y el operón *vanC* está localizado en el cromosoma y no es transferible. Este genotipo está asociado con una baja resistencia a la vancomicina (Hegstad *et al.* 2010).

Tabla 1. Genes asociados a farmacoresistencia en *Enterococcus* spp.

Genotipo	Ubicación	Expresión	Precursor
<i>vanA</i>	Plásmido o Cromosoma	Inducible	D-Ala-D-Lac
<i>vanB</i>	Plásmido o Cromosoma	Inducible	D-Ala-D-Lac
<i>vanC</i>	Cromosoma	Constitutiva o Inducible	D-Ala-D-Ser
<i>vanD</i>	Cromosoma	Constitutiva	D-Ala-D-Lac
<i>vanE</i>	Desconocida	Inducible	D-Ala-D-Ser
<i>vanF</i>	Desconocida	Desconocida	Desconocido
<i>vanG</i>	Desconocida	Inducible	Desconocido

En contraste con los sistemas de conjugación de bacterias Gram-negativas, la conjugación de especies del género *Enterococcus* no requiere pili, e involucra un sistema inducido por feromonas (Andrup y Andersen 1999). Esta transferencia genética lateral permite la rápida diseminación de la resistencia a antibióticos.

Los plásmidos inducidos por feromonas más estudiados en *E. faecalis* son: pCF10, pAD1 y pPD1. La transferencia de estos plásmidos ocurre en respuesta a feromonas sexuales específicas, los cuales son péptidos secretados por células receptoras libres de plásmidos. La recepción de feromonas exógenas por la célula donadora causa la expresión de proteínas involucradas en el proceso de conjugación. La producción de la sustancia de agregación (AS) en la superficie de la célula donante facilita el contacto con la célula receptora mediante la unión con la sustancia de unión enterocócica (EBS) dispersa en la superficie, resultando en la conjugación y la habilidad de transmitir resistencia a antibiótico a la célula receptora (Clewell *et al.* 2002).

Las feromonas liberadas por plásmidos pCF10, pAD1 y pPD1 son pAD1 o cCF10, cAD1 y cPD1 respectivamente (Folli *et al.* 2008). Los plásmidos de *Enterococcus* también pueden ser utilizados para realizar el intercambio genético de factores de virulencia.

2.10 Enterococos resistentes a vancomicina (ERV)

Los enterococos resistentes a vancomicina (ERV) han tomado gran importancia debido a que son causantes de infecciones intrahospitalarias lo cual, ha conducido a realizar una mayor cantidad de estudios que definen las características de colonización de estos microorganismos.

Las cepas ERV se aislaron por primera vez en Europa durante el lapso 1986-1987 en Francia y Reino Unido, aunque poco tiempo después se les empezó a detectar en Estados Unidos, Australia, Argentina, Japón, etc. En 1993 la incidencia de estos microorganismos en los hospitales estadounidenses ascendió hasta el 12%.

El uso terapéutico de la vancomicina empezó a destacar al iniciar los 80s y tomó aún más impulso a mediados de esa misma década al aparecer formulaciones comerciales orales; no obstante, su demanda máxima mundial tuvo lugar en 1994, año en el que precisamente iniciaron los intentos por restringir su prescripción, ante la desafortunada aparición y propagación de numerosas bacterias resistentes a vancomicina (Hidron *et al.* 2008).

Las infecciones por enterococos asociadas a ambientes hospitalarios emergieron de dos formas distintas en Estados Unidos. La primera ocurrió a finales de los 70s y fue asociada con la introducción de cefalosporinas de tercera generación; en esta época, *E. faecalis* se aisló en un 90-95% de los aislamientos de enterococos. La segunda ocurrió por *E. faecium*, la cual es más frecuente que presente resistencia a vancomicina y ampicilina comparándola con *E. faecalis*, esta tendencia fue en incremento en los hospitales de Estados Unidos desde los 90s, haciéndose también presente en otras partes del mundo. En Estados Unidos las infecciones con ERV aumentaron de 9,820 en el año 2000 a 21,352 en el año 2006 (Ramsey y Zilberberg 2009), ahora *E. faecium* es el microorganismo comúnmente causante de infecciones intrahospitalarias, dejando atrás a *E. faecalis*. Este cambio entre especies es de primordial importancia, ya que *E. faecium* se ha vuelto muy difícil de tratar. En Estados Unidos, el porcentaje de aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina paso de ser nula en los años 80s a aumentar a más del 80% en el 2007 (Arias y Murray 2008). Por lo contrario, solo el 5% de los aislamientos de *E. faecalis* son resistentes a vancomicina. Los Enterococos multifarmacorresistentes son actualmente un problema menor en países europeos, los informes iniciales de ERV en Europa a finales de los 80s eran de organismos colonizadores de tracto gastrointestinal de animales y humanos. Incluso se presentó una fuerte correlación entre el uso de la avoparcina, un antibiótico glicopéptido que se utilizó en la alimentación animal, y la aparición de ERV. En Europa se llevó a la prohibición de este compuesto en 1996 (Werner *et al.* 2008). A pesar de tomar estas medidas, se observó un aumento en la prevalencia de enterococos resistentes a ampicilina y vancomicina en infecciones hospitalarias. Por ejemplo, en Países Bajos, el número de infecciones causadas por enterococos resistentes a ampicilina aumentó de ~10 en el año 1999 a ~59 en el año 2005 (Top *et al.* 2008). Para el 2007 la resistencia a vancomicina en aislamientos de enterococos en Europa varió de más del 30%, en países como Grecia e Irlanda, a menos del 1% en países escandinavos. En América Latina, un estudio multicéntrico hecho en 4 países encontró que

la mayoría de las infecciones por enterococos (78% apróx.) son causadas por *E. faecalis* sensible a vancomicina y ampicilina, mientras que el 22% son causadas por linajes genéticos de *E. faecium* multifarmacoresistente, muy similar a lo observado en Estados Unidos (Panesso *et al.* 2010). En Asia, el número de infecciones causadas por *E. faecium* resistente a vancomicina aún permanece bajo (Liu *et al.* 2011).

2.10.1 Fuentes de infección de ERV

En años anteriores, la fuente de infecciones por parte de especies de enterococos en la mayoría de los pacientes fue a través de la propia microbiota endógena. Sin embargo, el marcado aumento de infecciones por enterococos entre los años 1980s y 1990s llevó a realizar estudios que demostraron que la forma primaria de transmisión de enterococos patogénicos es paciente-paciente, ocurriendo a través de las manos de profesionales de la salud (Hayden 2000). Esta transmisión puede estar involucrada con la inoculación directa en vía intravenosa o catéteres urinarios. Uno de los mecanismos más probables es que las cepas que colonizan el tracto gastrointestinal de los trabajadores del área de la salud son las que colonizan a pacientes con baja resistencia a la colonización (Donskey *et al.* 2004; Vollar y Clasener 1994). Por lo que nuevas cepas formaran parte de la microbiota endógena del paciente, lo cual sirve como plataforma para una infección. La adquisición de cepas de enterococos que acarrean con ellos genes que codifican resistencia a antibióticos permite que estos persistan en el tracto gastrointestinal por medio de presión selectiva en pacientes hospitalizados que reciben constantemente tratamiento con antibióticos de amplio espectro (Donskey *et al.* 2000).

El contacto frecuente con los profesionales de la salud y el movimiento de los pacientes colonizados a diferentes entornos hospitalarios, son indudablemente algunas de las razones responsables de estos patrones de transmisión (Moreno *et al.* 1995).

Los enterococos pueden persistir hasta 60 minutos después de la inoculación en manos (Noskin *et al.* 1995) y hasta 4 meses en superficies inanimadas, donde pueden servir como reservorio para la transmisión continua en ausencia de una descontaminación regular (Kramer *et al.* 2006).

Los termómetros aparecen como la superficie más común en transmisión de ERV (Livornese *et al.* 1992). El ambiente hospitalario fácilmente está contaminado con ERV, encontrándose las densidades más altas en dispositivos médicos (estetoscopios, monitores de presión arterial, bombas intravenosas de líquidos, etc.) batas, rieles de cama, mesas de noche, etc. (Bonten *et al.* 1998).

3. JUSTIFICACIÓN

Enterococcus spp. es un microorganismo que forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre lo cual facilita su transformación a patógeno en pacientes susceptibles. La capacidad de adquirir resistencia en contra de antibióticos como son los glicopéptidos lo hacen uno de los microorganismos con mayores tasas de infección en ambientes intrahospitalarios. Los genes que confieren resistencia a glicopéptidos se pueden encontrar dentro de plásmidos los cuales pueden ser transferidos fácilmente de manera horizontal a otros microorganismos.

Así mismo, su capacidad de sobrevivir en condiciones adversas por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, el transmitirse en el hospital a través del personal de la salud o de equipos contaminados y el aumento de la resistencia a glicopéptidos son características que en conjunto lo hacen uno de los microorganismos de mayor importancia intrahospitalaria por lo cual, se debe de mantener bajo vigilancia continua. Además, se requieren estudios más exhaustivos acerca del mecanismo molecular que confiere resistencia a glicopéptidos en este microorganismo.

4. HIPÓTESIS

En México, existe circulación de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina debido a que presentan los genes asociados a resistencia a glicopéptidos *vanA* o *vanB* adquiridos mediante transferencia horizontal de elementos móviles.

5. OBJETIVO GENERAL

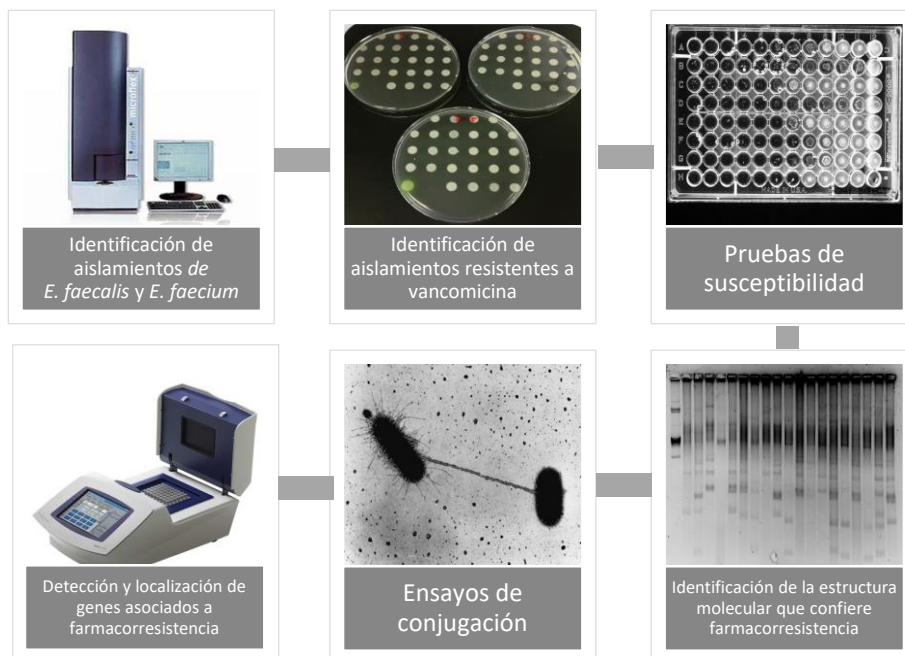
Realizar la caracterización del mecanismo molecular que confiere resistencia a glicopéptidos en *E. faecium* y *E. faecalis*.

5.1 Objetivos específicos

1. Identificar aislamientos de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a glicopéptidos.
2. Obtener el perfil de susceptibilidad a diversos antibióticos de importancia clínica.
3. Identificar los genes asociados a resistencia a glicopéptidos y su localización.
4. Determinar el potencial conjugativo de aislamientos de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a glicopéptidos.
5. Identificar la estructura molecular portadora del gen que confiere resistencia a glicopéptidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general



6.2 Aislamientos clínicos

Para este trabajo de investigación se colectaron aislamientos provenientes del Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde” en Guadalajara, Jalisco, así como del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en Monterrey, Nuevo León.

El periodo de colección fue de enero del 2011 a diciembre del 2017. Los aislamientos colectados de enero del 2011 a diciembre del 2014 (n=53) corresponden a aislamientos previamente identificados y caracterizados por nuestro grupo de trabajo, mientras que los aislamientos colectados de enero del 2015 a diciembre del 2017 no contaban con previa identificación.

Los aislamientos de cada hospital se recibieron en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde se corroboró su identificación.

6.3 Identificación de aislamientos de *Enterococcus* spp.

Para realizar la identificación de los aislamientos se empleó espectrometría de masas, utilizando MALDI-TOF MS de Bruker Byotiper. A los aislamientos identificados como *E. faecium* o *E. faecalis* se les determinó su capacidad de desarrollar resistencia a vancomicina, utilizando esta como criterio de selección para los aislamientos que fueron incluidos en el estudio.

6.3.1 Identificación de aislamientos a nivel especie

Se utilizó la técnica de extracción directa, en la cual se obtuvo una muestra del microorganismo a partir de un medio de cultivo puro de 18-24 h de incubación. Se aplicó una capa fina del microorganismo (una colonia aproximadamente) sobre el objetivo de la tarjeta metálica (una tarjeta de 96 pozos de acero inoxidable, Bruker Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente, se le adicionó 1 µL de ácido fórmico al 70% y se dejó secar antes de agregar 1 µL de matriz HCCA (una solución saturada de ácido alfa ciano-4-hidroxicinámico, acetronitrilo y ácido trifluoroacético) (Levésque *et al.* 2015).

Seguido de esto se introdujo la tarjeta en el espectrómetro, se programó la sesión de lectura y el espectro obtenido para la muestra problema se comparó de manera automática con los espectros de la base de datos del software específico de identificación. Se hizo un análisis de los picos obtenidos los cuales se compararon con la base de datos obteniéndose un score logarítmico cuyo valor en base al grado de similitud permitió definir género y especie (Lévesque *et al.* 2015; García *et al.* 2012).

6.3.2 Selección de aislamientos resistentes a vancomicina

Para identificar a los aislamientos de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina se utilizó la técnica de dilución en agar, la cual se realizó según lo establecido por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Para preparar la solución estándar al 0.5 de la escala de McFarland, se tomaron de 3 a 5 colonias aisladas de un medio de cultivo de 18 a 24 h en agar sangre y se transfirieron a un tubo con 4-5 mL de solución salina al 0.85%, se leyó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm, el rango de lectura establecido fue de entre 0.080 a 0.130 para que la solución correspondiera a la escala deseada.

Una vez ajustado el inóculo, utilizando una micropipeta, se tomaron 5 µL del mismo y se inocularon por goteo en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton que contenía 6µg/mL de vancomicina. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 37°C por 24 h.

Se utilizaron como cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 (Susceptible a vancomicina) y *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina).

Transcurrido el periodo de incubación, se consideraron como presuntivamente resistentes a vancomicina a aquellos aislamientos que presentaron crecimiento en el medio de cultivo que contenía este antibiótico.

6.4 Detección genotípica de resistencia a vancomicina

Para realizar la detección de los genes *vanA* o *vanB* en ADN total se realizó la obtención de ADN por la técnica de lisis térmica, la cual se realizó de la siguiente manera: los aislamientos se sembraron en agar sangre y se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Se tomaron aproximadamente 3 colonias, las cuales se resuspendieron en 150 µL de agua mili Q estéril y se homogenizaron utilizando un vortex. Posteriormente se les aplicó calor utilizando un baño seco a una temperatura de 85-100°C durante 10 min. Realizado esto, se centrifugaron por 10 min a 12,000 g, se obtuvieron los sobrenadantes y se depositaron en viales estériles para finalmente ser congelados a -20°C para su posterior uso.

Los genes *vanA* y *vanB* se identificaron mediante PCR de punto final utilizando las condiciones descritas por (Clark *et al.* 1993). Se utilizó una mezcla de reacción con dNTP's

al 0.2 mM, MgCl₂ al 1.5 mM, Tris al 10 mM (pH 8.3), KCl al 50mM, 0.5 µM de cada primer y 2.5 U de AmpliTaq Polimerasa. Las secuencias de los iniciadores que se utilizaron son las reportadas por (Clark *et al.* 1993) y se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores empleados para amplificación de los genes *vanA* y *vanB*.

Primer	Secuencia	Producto
<i>vanA</i>-F	5'-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A	1,030 pb
<i>vanA</i>-R	5' -CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA	
<i>vanB</i>-F	5'-GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA	433 pb
<i>vanB</i>-R	5'-CCG CCA TCC TCC TGC AAA AAA	

Las condiciones de amplificación que se utilizaron son las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 4 min, 30 ciclos con un paso de desnaturalización por 30 s a 95°C, un paso de alineamiento por 1 min a 52°C y un paso de extensión por 1 min a 72°C; 1 ciclo de elongación a 72°C por 1 min. Posteriormente se realizó una electroforesis convencional con un gel de agarosa al 1.8%. Para cada pocillo se tomó una mezcla de 5 µL de la reacción, la cual se mezcló con 1µL de buffer de carga y se utilizó un marcador de 100-1000 pb. Se aplicó un voltaje de 110 Volts por 40 min. Por último, el gel se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm y las imágenes se documentaron en formato digital.

6.5 Perfil de susceptibilidad a antibióticos

Se llevaron a cabo pruebas fenotípicas de susceptibilidad mediante el método de microdilución en caldo siguiendo el protocolo M100 (2018) del CLSI. Los antibióticos que se analizaron fueron: vancomicina, teicoplanina, linezolid, levofloxacino, ciprofloxacino, penicilina, ampicilina, daptomicina, gentamicina de alto nivel de resistencia y estreptomicina de alto nivel de resistencia.

6.5.1 Preparación del inóculo

Los aislamientos fueron sembrados en agar sangre e incubados por 24 h a 37°C. Por cada aislamiento se preparó una placa de 96 pocillos con diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar. Las placas se llenaron utilizando una pipeta multicanal con 200 µL de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posterior a la incubación de los cultivos, se prepararon las soluciones de trabajo realizando una suspensión de colonias en 5 mL de solución salina que se ajustó a una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland, enseguida se realizó una dilución 1:150 en 12 mL de caldo Müeller-Hinton. El inóculo final fue de 5×10^5 UFC/mL y enseguida (no más de 15 minutos tras su preparación).

6.5.2 Preparación de las placas

Por cada aislamiento se preparó una placa de 96 pocillos (12x8) con diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar. Se añadieron 200 µL de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posteriormente se añadió un volumen de 100 µL de caldo Müeller-Hinton en todos los pocillos con excepción de los que tenían los antibióticos con la concentración más alta y las diluciones se realizaron haciendo pases consecutivos de 100 µL (2 a la 3, 3 a la 4, 4 a la 5 etc) de una celda a la otra empleando una micropipeta y se eliminaron los 100 µL de la última celda de cada antibiótico, de tal manera que antes del inóculo todas las celdas quedarán con un volumen total de 100 µL. Los dos últimos pocillos de la última fila se dejaron como controles negativos.

se transfirieron con una pipeta multicanal 100 µL del inóculo a cada pocillo de la placa, con excepción de los controles negativos. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 a 20 h y 24 h para el caso de la vancomicina. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se apilaron más de cuatro a cinco placas dentro de la incubadora. Después del periodo de incubación se realizó la lectura de los resultados.

VAN	TEI	LIN	LEV	CIP	PEN	AMP	DAP	EST	GEN		C(+)
128	128	32	32	16	64	64	16	2000	1000		
64	64	16	16	8	32	32	8	1000	500		
32	32	8	8	4	16	16	4	500	250		
16	16	4	4	2	8	8	2				
8	8	2	2	1	4	4	1				
4	4	1	1	0.5	2	2					
2	2	0.5	0.5	0.25							
1											C(-)

Figura 3. Esquema de la distribución de los antibióticos y las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) empleadas en la placa de microtitulación.

VAN: vancomicina, **TEI:** teicoplanina, **LIN:** linezolid, **LEV:** levofloxacino, **CIP:** ciprofloxacino, **PEN:** penicilina, **AMP:** ampicilina, **DAP:** daptomicina, **EST:** estreptomicina de alto nivel de resistencia, **GEN:** gentamicina de alto nivel de resistencia.

La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos usados como control positivo. Los controles positivos presentaron una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para la lectura se utilizó un lector de placas de microtitulación con luz led que permitió observar el crecimiento bacteriano. Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) que corresponde a la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo en estudio y se emplearon los puntos de corte indicados en la tabla 3 para clasificar los aislamientos como resistente, intermedio o susceptible. Para el control de calidad del estudio se emplearon las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 29213.

Tabla 3. Puntos de corte para los antibióticos analizados.

Clase de antibiótico	Antibiótico	CMI (µg/mL)		
		S	I	R
Aminoglucósidos	Gentamicina (ANR)	-	-	Cualquier crecimiento
	Estreptomicina (ANR)	-	-	Cualquier crecimiento
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	≤1	2	≥4
	Levofloxacino	≤2	4	≥8
Glicopéptidos	Vancomicina	≤4	8-16	≥32
	Teicoplanina	≤8	16	≥32
Lipopéptidos	Daptomicina	≤4	-	-
Penicilinas	Ampicilina	≤8	-	≥16
	Penicilina	≤8	-	≥16
Oxazolidinonas	Linezolid	≤2	4	≥8

6.6 Identificación y localización de genes asociados a farmacorresistencia

Para llevar a cabo la búsqueda de los genes *vanA* y *vanB* se obtuvo el ADN genómico y plasmídico para posteriormente realizar su identificación.

6.6.1 Extracción de ADN genómico

Para extraer el ADN genómico se utilizó el método de lisis enzimática (Hall *et al.* 1992) como se describe a continuación: los aislamientos se sembraron en agar sangre y se incubaron por 24 h a 37°C. Se resuspendieron 4-5 colonias en 200 µL de Tris-HCl 100 mM y se añadieron 150 µg de lisozima utilizando un aplicador de madera, dejándose en incubación por 2 h a 37°C. Posteriormente se añadieron 200 µL de TE 1x con SDS al 1%, 6 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó por 2 h a 55°C. Se agregaron 250 µL de fenol saturado y se mezcló por inversión. Posteriormente se agregaron 250 µL de SEVAG (Cloroformo:alcohol isoamílico) y se mezcló, se añadieron 100 µL de TE 1x y se agito por inversión durante 5 minutos para después centrifugar a 14 000 rpm por 8 minutos. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se hizo de nuevo la extracción con 250 µL de fenol saturado, se mezcló por inversión, se agregaron 250 µL de SEVAG, se mezcló y se agregaron 100 µL de TE 1x, se realizó una agitación por inversión durante 5 minutos y se centrifugó a

14 000 rpm por 8 minutos. La fase acuosa fue transferida a otro tubo al cual le fueron añadidos 2.33 volúmenes de etanol absoluto, hasta observar la formación de la hebra de ADN y se dejó precipitando a -20°C por 1 h. Transcurrido este tiempo la muestra se centrifugó por 5 minutos a 14 000 rpm y fue lavada dos veces con etanol al 70%. Las muestras se secaron a temperatura ambiente hasta observar que la pastilla se encontraba completamente seca, esto sin dejar pasar mucho tiempo. La pastilla fue resuspendida en 100 µL de TE 1x y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

6.6.2 Extracción de ADN plasmídico

Para realizar la extracción de ADN plasmídico y realizar procedimientos moleculares se utilizará la metodología recomendada por Kieser con algunas modificaciones (Kieser 1984).

Se suspendió la colonia de estudio en 1mL de solución salina y se centrifugó por 5 minutos a 5 000 rpm, posteriormente se descartó el sobrenadante. Se agregaron a la pastilla obtenida 100 µL de una solución compuesta por glucosa, Tris-HCl 500 mM, EDTA 500 mM a pH 8, se resuspendió y se agregaron 100 µL de lisozima (1 mg/mL), se mantuvo a 37°C por 1 h. Se agregaron 200µL de una solución compuesta por SDS al 10% y NaOH 1M, se homogenizó con vortex y se dejó en refrigeración por 5 minutos. Se agregaron 150 µL de acetato de sodio 3M, se agitó por inversión y se dejó en refrigeración por 5 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a 14 000 rpm para posteriormente transferir el sobrenadante a un tubo limpio, al cual se le añadieron 800 µL de etanol al 95% dejándose a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 13 500 rpm, descartándose el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%, centrifugando por 10 minutos a 13 500 rpm. Se dejó evaporar el etanol hasta que la pastilla quedara completamente seca, posteriormente se resuspendió en 30 µL de TE 1x.

Los genes *vanA* y *vanB* se identificaron mediante PCR de punto final bajo las condiciones que se describieron anteriormente.

6.7 Determinación del patrón electroforético de los plásmidos

6.7.1 Extracción de ADN plasmídico

En los aislamientos clínicos y cepas transconjugantes se determinó el patrón electroforético mediante la extracción del ADN plasmídico utilizando la metodología sugerida por Anderson y McKay (Anderson y McKay 1983).

El microorganismo se creció en 5 mL de caldo soya, durante toda la noche a 37°C, se realizó una centrifugación a 13 500 rpm por 3 minutos para obtener una pastilla, la cual fue resuspendida en 380 µL de una solución de sucrosa al 6.7%, Tris 50 mM y EDTA 1 mM, y se incubó a 37°C por 10 minutos. Se agregaron 97 µL de una solución compuesta por lisozima (10 mg/mL) y Tris 25 mM y se dejó incubando a 37°C por una hora. Posteriormente se agregaron 49 µL de una solución de EDTA 0.25 M y Tris 50 mM, así como 28 µL de una solución de SDS 20%, Tris 50 mM y EDTA 20 mM, se mezcló con vortex y se incubó a 37°C por 10 minutos. Se agregaron 28 µL de NaOH 2N, se mezcló suavemente por inversión durante 10 minutos, posteriormente se agregaron 50 µL de Tris-HCl 2M y se continuó mezclando por 3 minutos más. Se agregaron 72 µL de NaCl 5M y 700 µL de fenol saturado, se mezcló completamente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos. Se removió la fase superior y se transfirió a un tubo limpio.

6.7.2 Patrón electroforético

Para realizar la electroforesis se utilizaron 20 µL de muestra mezclados con 8 µL de buffer de carga, en un gel de agarosa al 0.7%, a 95-100 V por 3 h. Se utilizó ADN plasmídico purificado de *Escherichia coli* (NCTC 50192) como patrón de peso molecular de referencia para realizar las determinaciones del peso molecular de las bandas obtenidas para los aislamientos en estudio.

El análisis de las tallas moleculares de las bandas obtenidas se realizará por regresión lineal.

6.8 Ensayos de conjugación

6.8.1 Selección de cepas receptoras y concentración de antibióticos

Los ensayos de conjugación se realizaron mediante el método de apareamiento acoplado a filtro así como en fase líquida.

Se seleccionaron como cepas receptoras *Staphylococcus haemolyticus* y *E. faecalis* con susceptibilidad a vancomicina y resistencia a linezolid.

Las concentraciones de los antibióticos de selección se eligieron realizando pruebas en donde se inoculaban cepas resistentes a vancomicina y susceptibles a linezolid así como cepas resistentes a linezolid y susceptibles a vancomicina, la mezcla de concentraciones utilizada fue aquella en la que se inhibió por completo el crecimiento de ambas cepas,

Para ambos métodos, los aislamientos donadores y receptores se crecieron en agar sangre por 24 h a 37°C.

6.8.2 Método de apareamiento en fase líquida

Para el método en fase líquida (Clewell *et al.* 1985) se inocularon colonias jóvenes de los aislamientos donadores y receptores en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI), de forma individual, y se dejaron en incubación por 24 h a 37°C. Posteriormente donador y receptor se mezclaron a una proporción 1:10 (50 µL del donador y 500 µL del receptor) y se adicionaron 4.5 mL de caldo BHI, se dejaron en incubación por 4-5 h a 37°C. Pasado este período, se homogenizó el cultivo utilizando un vórtex, se tomaron 100 µL del mismo y se colocaron sobre agar BHI con vancomicina [12 µg/mL] y linezolid [8 µg/mL], utilizando una asa de Digrafsky se extendió por toda la superficie del medio. Estas placas se inocubaron por 48 h a 37°C.

6.8.3 Método de apareamiento en fase sólida acoplado a filtro

Para el método de apareamiento acoplado a filtro (Lampkowska *et al.* 2008), se tomaron colonias (24 h en agar sangre) y se inocularon en 5 mL de caldo BHI y se dejaron incubando por 5-6 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, ambos aislamientos se mezclaron en una relación 1:5 (170 µL del donador y 850 µL del receptor), esta mezcla se centrifugó a 7,000 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y se homogenizó el pellet obtenido con

250 µL de caldo BHI fresco. Se tomaron 250 µL de esta mezcla y se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm) dispuesta en agar BHI. Se permitió que el inóculo penetrara en la membrana y se absorbiera correctamente y posteriormente se mantuvo en incubación por 24 h a 37°C. Transcurrido este periodo de tiempo, se transfirió la membrana de nylon con crecimiento bacteriano a un tubo que contenía 5 mL de solución salina al 0.85% y se mezcló utilizando un vórtex, posteriormente, se tomaron 100 µL y se colocaron sobre agar BHI con vancomicina [12 µg/mL] y linezolid [8 µg/mL], utilizando una asa de Digralsky se extendió por toda la superficie del medio. Estas placas se inocubaron por 48 h a 37°C.

6.8.4 Análisis fenotípico de colonias presuntivamente transconjugantes

Se realizó el recuento de colonias transconjugantes y posteriormente se realizaron pruebas de susceptibilidad para determinar la CMI a vancomicina, realizando la metodología antes descrita.

6.8.5 Análisis genotípico de colonias presuntivamente transconjugantes

Se realizó la obtención de ADN por medio de la técnica de lisis térmica, realizando la metodología mencionada anteriormente. Posteriormente se realizó la identificación del gen *vanA* en ADN total por medio de PCR punto final utilizando las condiciones de reacción descritas previamente.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de aislamientos de *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina.

Este proyecto contó con aislamientos clasificados en dos periodos. Los aislamientos pertenecientes al primer periodo, enero del 2011 a diciembre del 2014, formaron parte de un estudio previo realizado por el mismo equipo de trabajo (Bocanegra-Ibarias *et al.* 2015). Se obtuvieron 148 aislamientos de ambos hospitales, los cuales fueron identificados como *E. faecium*, de los cuales 53 presentaron resistencia a vancomicina además de presentar el gen *vanA*.

En el periodo de colección de enero del 2015 a diciembre del 2017 se obtuvieron 506 aislamientos de ambos hospitales. El 84% (n=427/506) fue identificado como *E. faecalis* y el 16% (n= 79/506) fue identificado como *E. faecium*. El 7.3% (n=37/506) de estos aislamientos presentaron resistencia a vancomicina.

Un total de 90 aislamientos (periodo 2011-2017) presentaron resistencia a vancomicina, de los cuales el 97.7% (n=88/90) fueron identificados como *E. faecium* mientras que el 3.3% (3/90) como *E. faecalis*.

Las principales salas hospitalarias en donde se recuperaron mayor cantidad de aislamientos con resistencia a vancomicina fueron unidad de cuidados intensivos 37% (n=33/90), medicina interna 24% (n=22/90), cirugía 21% (n=19/90), entre otros. Mientras que los principales especímenes fueron abscesos 30% (n=27/90), secreciones 20% (n=18/90), orina 16% (n=14/90), entre otros.

7.2 Perfil de susceptibilidad

Además de presentar altos porcentajes de resistencia para los glicopéptidos vancomicina y teicoplanina (100% y 98.8%, respectivamente) se presentaron altos porcentajes de resistencia para ciprofloxacino (100%), levofloxacino (98.8%) penicilina (97.7%) y ampicilina (97.7%). Para la estreptomicina y gentamicina de alto nivel de resistencia se obtuvieron porcentajes moderados de resistencia, 87.7% y 70%,

respectivamente. Para daptomicina la tasa de resistencia fue baja (6.6%). No se detectó resistencia para linezolid. Los perfiles de susceptibilidad de los ERV a los distintos antibióticos se muestran en la tabla 3.

Tabla 4. Susceptibilidad a distintos antibióticos.

* No susceptibles

Antibiótico	CMI ₉₀	CMI ₅₀	Rango	Resistentes n(%)	Intermedios n(%)	Sensibles n(%)
Vancomicina	>128	>128	32 - >128	90 (100)	0(0)	0 (0)
Teicoplanina	>128	128	4 - >128	89 (98.8)	0(0)	1 (1.1)
Linezolid	2	1	4 - ≤ 0.5	0 (0)	1 (1.1)	89 (98.8)
Levofloxacino	>32	>32	>32 - ≤ 0.5	89 (98.8)	0(0)	1 (1.1)
Ciprofloxacino	>16	>16	>16 - 16	90 (100)	0(0)	0 (0)
Penicilina	>64	>64	>64 - ≤ 2	88 (97.7)	0(0)	2 (2.2)
Ampicilina	>64	>64	>64 - ≤ 2	88 (97.7)	0(0)	2 (2.2)
Daptomicina	8	2	8 - ≤ 1	*6 (6.6)	0(0)	84 (93.3)
Gentamicina (ANR)	>1000	1000	>1000 - ≤ 250	63 (70)	0(0)	27 (30)
Estreptomina (ANR)	>2000	2000	>2000 - ≤ 500	79 (87.7)	0(0)	11 (12.2)

7.3 Identificación de genes asociados a resistencia a glicopéptidos y su localización

Como se mencionó anteriormente, 53 aislamientos pertenecientes al periodo de 2011 al 2014 fueron previamente caracterizados, a los cuales se les detectó el gen *vanA*.

En todos los aislamientos resistentes a vancomicina recuperados durante el periodo de 2015 al 2017 se detectó el gen *vanA*, en la figura 4 se presenta un gel de agarosa representativo en donde se visualizan aislamientos que presentaron el gen *vanA*.

El gen *vanB* no fue detectado en ninguno de los aislamientos analizados.

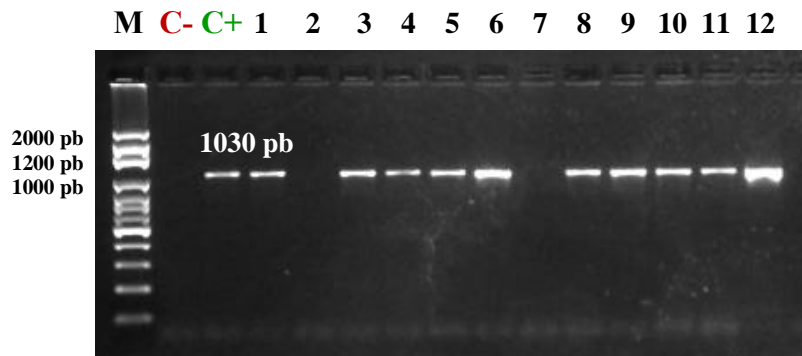


Figura 4. Gel de agarosa con productos de la detección molecular del gen *vanA* en ADN total.

M: Marcador de peso molecular. **C-:** Control negativo. **C+:** Control positivo. **1,3,4,5,6,8,9,10,11,12:** Muestras positivas para el gen *vanA*. **2,7:** Muestras negativas para el gen *vanA*.

En cuanto a la localización molecular del gen *vanA* se determinó que en el 58.8% (n=53) de los aislamientos el gen se encontraba integrado en cromosoma como en plásmido, el 18.8% (n=17) se encontraba integrado únicamente en plásmido y el 18.8% restante (n=17) se encontraba integrado únicamente en cromosoma.

7.4 Determinación del perfil plasmídico

Se identificaron 41 perfiles plasmídicos distintos, en la figura 5 se observa un gel de agarosa representativo donde se logran apreciar distintos perfiles plasmídicos obtenidos. En las muestras 2, 4, 5, 6, 7, 8, 14 y 18 se observa un patrón electroforético muy similar, con un perfil de bandas de 187.4 kb, 30.8 kb, 19.6 kb y 11.4 kb, aproximadamente. Cabe señalar que estas muestras fueron recuperadas entre los años 2015 y 2016. Así mismo, las muestras 1, 12 y 15 muestran un patrón electroforético similar entre sí, con bandas de 30.8 kb y 8.7, estos aislamientos fueron recuperados entre los años 2015, 2016 y 2017.

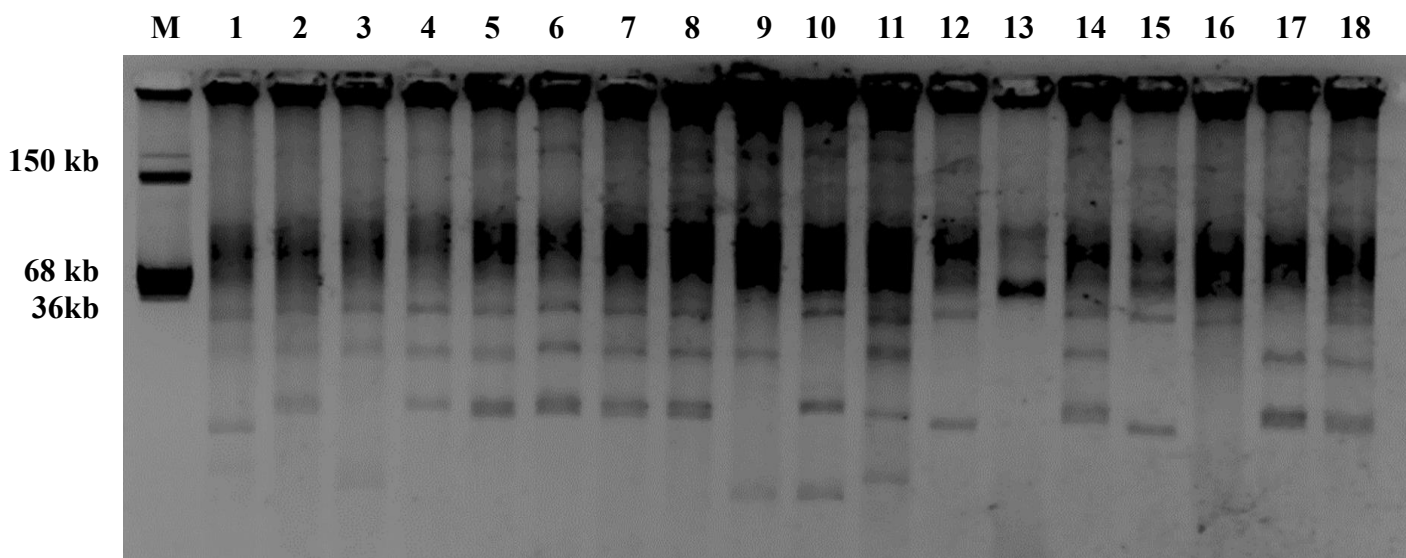


Figura 5. Gel de agarosa con diferentes perfiles plasmídicos.

M: Marcador. **1:** 15-3226. **2:** 16-1845. **3:** 17-0808. **4:** 16-1477. **5:** 17-0965. **6:** 16-1591. **7:** 16-0483. **8:** 15-1140. **9:** 16-0200. **10:** 16-0834. **11:** 17-1750. **12:** 17-1574. **13:** 16-0249. **14:** 16-1542. **15:** 16-0818, **16:** 17-1566. **17:** 17-1154. **18:** 16-1039.

7.5 Conjugación bacteriana

Mediante ensayos de conjugación en fase líquida y fase sólida acoplada a filtro se determinó la capacidad de los aislamientos de enterococos de transferir el o los plásmidos portadores del gen *vanA*. Primero se realizó la selección de cepas receptoras que fueron susceptibles a vancomicina y presentaron resistencia a linezolid, debido a que ninguno de los aislamientos incluidos en el estudio presentó resistencia a este antibiótico. Se analizaron cuatro aislamientos clínicos que correspondieron a *S. haemolyticus* y *E. faecalis*. Al obtener el perfil de plásmidos de estas posibles cepas receptoras se observó que en los cuatro aislamientos el contenido plasmídico era muy bajo, *S. haemolyticus* no portaba ningún plásmido, mientras que los tres aislamientos de *E. faecalis* portaban 2 plásmidos cada uno, tal y como se observa en la figura 6. En función de estos resultados estos aislamientos fueron seleccionados como cepas receptoras.

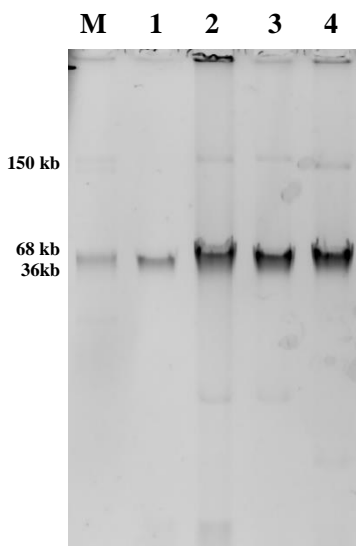


Figura 6. Perfiles plasmídicos de aislamientos receptores.

M: Marcador. **1:** 2975, *S. haemolyticus*. **2:** 16-1947, *E. faecalis*. **3:** 14-3165, *E. faecalis*. **4:** 18-1412, *E. faecalis*.

Dos de los aislamientos de enterococos analizados fueron capaces de transferir la capacidad de desarrollar resistencia a vancomicina mediante el método en fase sólida acoplado a filtro. Las colonias presuntivamente transconjugantes tuvieron CMI para vancomicina que se consideran como resistentes (tabla 5). Sin embargo, en ninguna de estas colonias se logró detectar el gen *vanA*.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria para vancomicina en colonias presuntivamente transconjugantes de *S. haemolyticus*.

Aislamiento	Colonia transconjugante	CMI para vancomicina
14349	Tc 1	$\geq 64 \mu\text{g/mL}$
	Tc 2	$\geq 64 \mu\text{g/mL}$
13-0956	Tc 1	$\geq 64 \mu\text{g/mL}$
	Tc 2	$\geq 64 \mu\text{g/mL}$

En ninguno de los demás aislamientos estudiados se logró una conjugación exitosa mediante fase líquida ni sólida en ninguna de las cuatro cepas receptoras utilizadas.

8. DISCUSIÓN

Enterococcus spp. es un patógeno oportunista que invade tejidos de hospederos con estado inmunológico comprometido. Se ha observado un aumento en la frecuencia de infecciones intrahospitalarias causadas por este microorganismo alrededor del mundo y esto está asociado con el incremento en el uso de antibióticos de amplio espectro (Uttley *et al.* 1989).

Desde su aparición, ERV se ha vuelto endémico en muchos hospitales a través del mundo. Pacientes con malignidades hematológicas, trasplantados, y con enfermedades en estado crítico muestran particular riesgo por colonización y subsecuente infección con VRE (Martínez *et al.* 2003). La CDC ha clasificado a ERV como un serio problema para la salud humana, siendo el causante del 30% de las 66,000 infecciones asociadas al cuidado de la salud por *Enterococcus* spp. registradas cada año en Estados Unidos (Arias y Murray 2011).

En este estudio, primeramente, se determinó la frecuencia en el número de infecciones causadas por las especies de mayor importancia intrahospitalaria dentro de este género, *E. faecium* y *E. faecalis*. Se observó una mayor frecuencia en el número de infecciones causadas por *E. faecalis* en comparación con *E. faecium*. En un estudio realizado por Billington y colaboradores (Billington *et al.* 2014) en Alberta, Canadá, se observó una mayor incidencia en el número de infecciones en torrente sanguíneo, esto en los años 2000-2008, por parte de *E. faecalis*, en donde la incidencia anual de *E. faecalis* fue de 4.5 por 10 000, mientras que para *E. faecium* fue de 1.6 por 100 000.

Sin embargo, el número de aislamientos que presentaron resistencia a vancomicina fue mayor para *E. faecium* que para *E. faecalis*, 97% y 3%, respectivamente. Distintos estudios muestran que se sigue esta misma tendencia en diferentes países, tal es el caso del estudio realizado por Chiang y colaboradores donde se determinó que la incidencia de *E. faecalis* resistente a vancomicina en 8 hospitales de Detroit aumentó de 0.72 por cada 1 000 pacientes en 2003 a 1.68 por cada 1 000 pacientes en 2009, mientras que para *E. faecium* resistente a vancomicina hubo un aumento de 1.97 a 2.67 por cada 1000 pacientes, esta tendencia se observa de igual forma en Atlanta, donde *E. faecium* presenta una mayor proporción de infecciones que lo observado para *E. faecalis* resistente a vancomicina (83%

vs 6%, respectivamente) lo mismo ocurrió en Michigan (71% vs 29%, respectivamente) (Chiang *et al.* 2016). Mientras que ERV era virtualmente inexistente en hospitales de Estados Unidos antes de 1990, en la actualidad 87% de los aislamientos de *E. faecium* provenientes de infecciones intrahospitalarias son resistentes a vancomicina, mientras que solo el 14% corresponde a *E. faecalis* (Edelsberg *et al.* 2014).

Entre las opciones terapéuticas existentes para contrarrestar las infecciones causadas por *E. faecium* y *E. faecalis* incluyen ampicilina (en caso de que el microorganismo sea susceptible) o vancomicina, este es utilizado como último recurso terapéutico (Uttley *et al.* 1989). En 1970-1980, *E. faecium* ganó alta resistencia a ampicilina y desde 1980 ha adquirido resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y glicopéptidos, particularmente vancomicina, *E. faecalis* también ha adquirido resistencia a aminoglucósidos, pero la resistencia a ampicilina y vancomicina es mucho más infrecuente que en *E. faecium* (Edelsberg *et al.* 2014).

En este estudio, además de presentar altos porcentajes de resistencia para los glicopéptidos vancomicina y teicoplanina (100% y 98.8%, respectivamente) se presentaron altos porcentajes de resistencia para levofloxacino (98.8%), ciprofloxacino (100%), penicilina (97.7%) y ampicilina (97.7%).

Para el caso del lipopéptido, daptomicina y la oxazolidona, linezolid, se obtuvieron altos porcentajes de susceptibilidad 98.9% y 100%, respectivamente. Debido a la emergencia y a la rápida diseminación de ERV, estos antibióticos han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de ERV, sin embargo, la resistencia a los mismos ya ha sido reportada (Guzman *et al.* 2016).

La habilidad que tienen estas especies para adquirir y diseminar determinantes de resistencia a antibióticos, como aquellos envueltos en la resistencia a vancomicina, incrementan su capacidad para colonizar o infectar al huésped, lo cual explica la reciente emergencia que representan estos organismos como patógenos intrahospitalarios (Arias y Murray 2011; Hendrickx *et al.* 2009; Palmer *et al.* 2012).

Existen ocho genotipos que codifican genes de resistencia a glicopéptidos (*vanA/B/C/D/E/G/L/M/N*), los cuales, difieren en el gen ligasa, el fenotipo de su resistencia y la secuencia génica. Los genotipos *van* encontrados con mayor frecuencia son *vanA* y *vanB*, siendo *vanA* el de mayor predominancia a nivel mundial (Cattoir y Leclercq 2013; Quintiliani y Courvalin 1994).

En el 100% de los aislamientos incluidos en este estudio se detectó el gen *vanA*, mientras que en ninguno el gen *vanB*. En México, el primer reporte de ERV fué en el 2005, en un aislamiento de *E. faecium* portador del gen *vanA*, después de este hallazgo la incidencia en nuestro país ha ido en aumento (Cuellar *et al.* 2007), esto ha quedado demostrado en distintos reportes en diferentes estados de la República Mexicana como Nuevo León, Jalisco, Querétaro y Ciudad de México (Bocanegra-Ibarias *et al.* 2015; Alatorre-Fernández *et al.* 2016; García *et al.* 2014; La distribución del genotipo en estos aislamientos varía notablemente de acuerdo a la región geográfica; en un estudio realizado por Coombs y colaboradores, se observó que los niveles de ERV en pacientes hospitalizados en Australia eran altos, con 37% para *E. faecium*, sin embargo, en Australia, esta resistencia es exclusivamente causada por el gen *vanB*, mientras que el gen *vanA* es el mayor determinante causante de resistencia a vancomicina en Europa y Estados Unidos (Coombs *et al.* 2014).

A diferencia del gen *vanA*, el cual frecuentemente se encuentra integrado en plásmido, el gen *vanB* se encuentra integrado en cromosoma, aunque algunas veces también puede ser encontrado en plásmidos; la facilidad con la que la transferencia horizontal de plásmidos ocurre sugiere que la aparición de *vanA* en ERV probablemente contribuya a un aumento considerable en su incidencia nivel mundial (Lee *et al.* 2018).

En este estudio, se determinó que en 54% de los aislamientos el gen *vanA* se encontraba integrado en plásmido y cromosoma, mientras que en el 17% se encontraba integrado únicamente en plásmido y el 17% restante integrado a cromosoma. Handwerger y colaboradores, detectaron aislamientos clínicos de *E. faecium* en los cuales el gen *vanA* residía en cromosoma. En algunos de estos aislamientos se detectó que el transposón Tn1546 presentaba su secuencia modificada, una inserción de 1,496 pb en la secuencia de inserción IS1251. Este transposón modificado tiene predilección por la integración a cromosoma y es

tentativamente nombrado como Tn5482 (Handwerger y Skoble 1995), probablemente un elemento similar a este transposón está involucrado en la diseminación del gen *vanA*, en los casos en los cuales este último se encontraba en cromosoma.

E. faecalis y *E. faecium* pueden acarrear de 1-6 plásmidos que van de 9 a más de 200 kb, sin embargo, los plásmidos que acarrean el operon Tn1546-*vanA* se encuentran en el rango de 25 a 90 kb (Panhan *et al.* 2015), de acuerdo al perfil plasmídico obtenido para los aislamientos resistentes a vancomicina, se obtuvieron en gran mayoría bandas que corresponden a ese rango de peso, sin embargo no se puede asegurar con exactitud que alguna de estas bandas correspondan con a estos plásmidos, ya que únicamente se realizó un análisis cualitativo del perfil plasmídico, se requiere una caracterización más completa para determinar que se trata de estos plásmidos.

Como se mencionó con anterioridad, se sabe que ambas especies de enterococos tienen la capacidad de diseminar los elementos genéticos relacionados con la resistencia a glicopéptidos por medio de conjugación bacteriana mediada por plásmidos conjugativos o por feromonas sexuales (Flannagan *et al.* 2003). En este estudio se utilizaron como receptores a aislamientos de *S. haemolyticus* y *E. faecalis* resistentes a linezolid y sensibles a vancomicina además de tener un bajo contenido plasmídico. Sin embargo no se obtuvieron colonias transconjugantes en ninguno de los casos, a pesar de utilizar el método acoplado a filtro así como en fase líquida, sugiriendo que ninguno de los aislamientos resistentes a vancomicina tuvo la capacidad de transferir el gen *vanA* por medio de conjugación bacteriana. Estudios demuestran que este es un evento que no se puede garantizar a pesar de contar con las condiciones óptimas para que suceda. Noble y colaboradores realizaron una co-transferencia de ERV a *S. aureus* seleccionando las colonias transconjugantes en agar con rifampicina y ertromicina, sin embargo no obtuvieron los mismos resultados utilizando vancomicina como agente selectivo. Además no obtuvieron resultados alentadores utilizando el método acoplado a filtro si no que utilizaron técnicas “no tradicionales”, realizaron una transferencia *in vivo* colocando a los aislamientos parenterales (donador y receptor) sobre la piel sin pelo de un ratón (Noble *et al.* 1992).

Wiegel y colaboradores realizaron experimentos de conjugación acoplada a filtro, utilizando ERV y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) como donadores y

E. faecalis / *S. aureus* como receptores, a partir de aislamientos clínicos. Estos experimentos no tuvieron éxito, lo cual atribuyen a que el único factor de selección utilizado para transconjugantes fue el uso de la vancomicina. La ausencia de selección de transconjugantes utilizando vancomicina se ha descrito anteriormente y es adjudicada al tiempo de inducción requerido por el aislamiento para que la resistencia a vancomicina sea expresada, por lo que células transconjugantes no logran desarrollar por completo su habilidad para expresar resistencia a este antibiótico y por lo tanto no hay crecimiento de las mismas. La transferencia de la resistencia a vancomicina ha sido detectada de *E. faecalis* a *S. aureus* utilizando diferentes antibióticos para la selección de transconjugantes además de utilizar técnicas no tradicionales de inoculación, como técnicas *in vivo*. Esta transferencia raramente ocurre *in vitro*, pero se ha documentado en una alta frecuencia (2×10^1 a 6×10^3 receptoras en piel de ratón) cuando las transconjugantes son seleccionadas en agar adicionado con rifampicina y eritromicina (Weigel *et al.* 2003).

Además, es de esperarse que la frecuencia de transferencia sea relativamente baja debido a que el plásmido enterocócico no es mantenido en distintas especies de *Staphylococcus*. Un estudio enfocado en el costo biológico del acarreamiento de plásmidos que contenían el operon Tn1546-*vanA* mostró una pérdida energética de aproximadamente del 4% para el hospedero que acarrea ese plásmido (Freitas *et al.* 2013; Johnsen *et al.* 2011; Johnsen *et al.* 2009). La gran complejidad del mecanismo de resistencia a vancomicina lleva la hipótesis de que representa un alto costo energético. De hecho, la expresión del operon de resistencia a vancomicina (Tn1546-*vanA*) en *S. aureus* muestra una gran pérdida energética en este hospedero lo cual justifica la baja diseminación de este mecanismo de resistencia en las especies de este género.

9. CONCLUSIONES

- Existe una mayor predominancia en el número de infecciones causadas por *E. faecalis* sobre *E. faecium*.
- La resistencia a vancomicina es mayormente expresada por aislamientos identificados como *E. faecium* en comparación de *E. faecalis*.
- Todos los aislamientos presentaron altos porcentajes de resistencia a vancomicina y teicoplanina, así como para levofloxacino, ciprofloxacino, ampicilina y penicilina.
- Los aislamientos presentaron altas tasas de susceptibilidad para daptomicina y linezolid.
- El 100% de los aislamientos presentaron el gen *vanA*.
- El gen *vanA* se encontró integrado en cromosoma y plásmido, de forma individual así como de forma simultánea.
- Se identificaron 41 perfiles plasmídicos distintos.
- Se obtuvieron aislamientos transconjugantes que mostraban resistencia a vancomicina fenotípicamente, no siendo así genotípicamente.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis más descriptivo del transposón presente en los aislamientos con genotipo *vanA* – fenotipo *vanB*.
- Realizar una caracterización más precisa de los plásmidos portadores del gen *vanA* utilizando técnicas más sensibles que permitan la obtención de una sola conformación del plásmido.
- Utilizar distintas especies bacterianas como receptoras y determinar su permisibilidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abt M, Buffie C, Susac B, Becattini S, Carter R, Leiner I, Keith J, Artis D, Osborne L, Pamer E. 2016. TLR-7 activation enhances IL-22-mediated colonization resistance against vancomycin resistant *Enterococcus*. *Science Translational Medicine*. 8:327ra25.

Alatorre-Fernández P, Mayoral-Teran C, Velázquez-Acosta C, Franco-Rodríguez C, Flores-Moreno K, Cevallos M, López-Vidal Y, Volkow-Fernández P. 2016. A polyclonal outbreak of bloodstream infections by *Enterococcus faecium* in patients with hematologic malignancies. *American Journal of Infection Control*.

Anderson D, McKay L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmids from lactic Streptococci. *Applied and environmental microbiology*. 46(3): 549-552.

Andrews F, Horder T. 1906. A study of streptococci pathogenic for man. *Lancet* 2: 708-83.

Andrup L, Andersen K. 1999. A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*. 145: 2001–2009.

Arias C, Murray B. 2011. E. in Harrison's Principles of Internal Medicine. 1180-1186 (McGraw Hill, New York).

Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. 1995. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*. 154:87-94.

Arthur M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P. 1996. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol Microbiol*. 21:33-44.

Barrow G, Felthman R. 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press. Pp. 66-7

Bearman G, Wenzel R. 2005. Bacteraemias: a leading cause of death. Arch Med Res. 36: 646–659.

Beezhol D, Slaughter S, Hayden M, Matushek M, Nathan C, Trenholme F. 1997. Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. Clinical Infectious Diseases. 24: 704-706.

Bergey D, Holt J. 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkin. P. 258.

Billington E, Phang S, Gregson D, Pitout J, Ross T, Church D, Leupland K, Parkins M. 2014. Incidence, risk factors, and outcomes for *Enterococcus* spp. Blood stream infections: a population-based study. Int J Infect Dis. 26: 76-82.

Bocanegra-Ibarias P, Flores-Treviño S, Camacho-Ortiz A, Morfin-Otero R, Villarreal-Treviño L, Llaca-Díaz J, Martínez-Landeros E, Rodríguez-Noriega E, Calzada-Güereca A, Maldonado-Garza J, Garza-González E. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico: First detection of VanB phenotype-*vanA* genotype. Enferm Infecc Microbiol Clin.

Bonten M, Slaughter S, Amberg A. 1998. The Role of “Colonization Pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci, an important infection control variable. Arch Intern Med. 158: 1127-1132.

Boyce J, Opal S, Chow J, Zervos M, Potter G, Sherman C. 1994. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* transferable *vanB* class vancomycin resistance. Journal of Clinical Microbiology. 32:1148-1153.

Brand I, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo R, Pamer E. 2007. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. Journal of Experimental Medicine. 204: 1891-900.

Brown D, Brown N, Cookson B, Duckworth G, Farrington M., French G, King L, Lewis D, Livermore D. 2006. National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia

surveillance Working Group report to the Department of Health – August 2004. J Hosp Infect. 62 (Suppl. 1): 1–27.

Budzic J, Schneewind O. 2006. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. J Clin Invest. 116: 2582–2584.

Cabell C, Abrutyn E, Karchmer A. 2003. Cardiology patient Page. Bacterial endocarditis: the disease, treatment, and prevention. Circulation. 107: e185-7.

Carias L, Rudin S, Donskey C, Rice L. 1998. Genetic Linkage and Cotransfer of a Novel, *vanB*-Containing Transposon (Tn5382) and a Low- Affinity Penicillin-Binding Protein 5 Gene in a Clinical Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolate. J of Bacteriol. 180: 4426-4434.

Cash H, Whitham C, Behrendt C, Hooper L. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. Science. 313:1126-1130.

Cattoir V, Lecomte R. 2013. Twenty five years of shared life with vancomycin resistant enterococci: is it time to divorce?. J Antimicrob Chemother. 68: 731-42.

Chenoweth C, Schaberg D. 2000. The epidemiology of enterococci. European Journal of Clinical Microbiology Reviews. 13: 686-707.

Chiang H, Perencevich E, Nair R, Nelson R, Samore M, Khader K, Chorazy M, Herwaldt L, Blevins A, Ward M, Schweizer M. 2016. Incidence and Outcomes Associated with Infections Caused by Vancomycin-Resistant Enterococci in the United States: Systematic Literature Review and Meta-Analysis. Infect Control Hosp Epidemiol. 1-13.

Chow J, Thal L, Perri M, *et al.* 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 37:247-7.

Chuang-Smith O, Wells C, Henry-Stanley M, Dunny G. 2009. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. Infect Immun. 77:539-48

Clark N, Cooksey R, Hill B, Swenson J, Tenover F. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2311.

Clewell D, An F, White B, Gawron-Burke C. 1985. *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). *J. Bacteriol.* 162 (3): 1212-1220.

Clewell D, Victoria Francia M, Flannagan S, An F. 2002. Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid.* 48: 193–201.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: Twenty-seventh informational supplement M100-S27. 2017.

Collin B, Leather H, Wingard J, Ramphal R. 2001. Evolution, incidence and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clinical infectious Diseases.* 33:947-53.

Coombs G, Pearson J, Daley D, Le T, Robinson O, Gottlieb T. 2014. Molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 52: 897-905.

Cuellar J, Galindo A, Guevara V, Pérez C, Espinosa L, Rolón A, et al. 2007. Vancomycin resistant Enterococci, Mexico city. *Emerging Infectious Diseases.* 13: 799-798.

De Fatima silva Lopes M, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques J, Tenreiro R, Crespo M. 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of Enterococci. *International Journal of Food Microbiology.* 103:191-8.

Donskey C. 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clinical Infectious Diseases.* 39 (2): 219-226.

Dunny G. 1990. Genetic functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid.* 4:689-696.

Eckburg P, Bik E, Bernstein C, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308: 1635-1638.

Edelsberg J, Weycker D, Barron R, Li X, Wu H, Oster G. 2014. Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78: 255-262.

Faclin R, Sahm F. 1995. *Enterococcus* In: Murray R.R. Sixth Edition Manual of Clinical Microbiology. American Society of Microbiology. Washington D.C.

Folli C, Mangiarotti L, Folloni S, Alfieri B, Gobbo M, Berni R, Rivetti C. 2008. Specificity of the TraA-DNA interaction in the regulation of the pPD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*. *J Mol Biol.* 380: 932–945.

Frank K, Arnes A, Grindle S, MAnias D, Svhliefert P, Dunny G. 2012. Use of recombinase based in vivo expression technology to characterize *Enterococcus faecalis* gene expression during infection identifies in vivo-expressed antisense RNAs and implicates the protease Eep in pathogenesis. *Infect Immun.* 80: 539-49.

Frank, Vergidis P, Brinkman C, Greenwood K, Barnes A, MAndrekar J, Schlievert P, Dunny G, Patel R. 2015. Evaluation of the *Enterococcus faecalis* biofilm- associated virulence factors AhrC and Eep in rat foreign body osteomyelitis and in vivo biofilm-associated antimicrobial resistance. *PLoS One.* 10: e013018.

Franz C, Holzapfel W, Stiles M. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* 47: 1–24.

Freitas A, Novais C, Tedim A, Francia M, Baquero F, Coque T, Peixe L. 2013. Microevolutionary events involving narrow host plasmid influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus*. *PLoS One.* E60589.

Frenkel J, Armstrong D. 2001. Immunocompromise-dependent infection rather than opportunistic infection. *Int J Infect Dis.* 5:175-6

Galli D, Wirth R. 1991. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* sex pheromone plasmids identifies a single homologous DNA region which codes for aggregation substance. *J. Bacteriol.* 173: 3029-3033.

García M, Leo-Amador G, Avila-Morales J, Zaldívar-Lelo G. 2014. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Isolated from community acquired infections and colonizations in Querétaro City, Mexico. *American Journal of Infection Control.* 42:577-83.

García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. 2012. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev Chilena Infectol.* 29: 263-272.

Garsin D, Frank K, Silanpaa J, Ausubel F, Hartke A, Shankar N, Murray B. 2014. Pathogenesis and models of Enterococcal infection. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: From commensals to leading causes of a drug resistant infection.* Boston.

Garza-Ramos, U., H. Barrios, *et al.* 2014. Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 483-485.

Gilmore M, Rauch M, Ramsey M, Himes P, Varahan S, Manson J, Lebreton F, Hancock L. 2015. Pheromone killing of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* V583 by native commensals strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 112:7273-8.

Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.* 26: 163–171.

Glew R, Keroack M. 1998. Vancomycin and teicoplanin. In: *Infectious Diseases.* Chapter 24 Second edition. Saunders.

Gordon M. 1905. A ready method of differentiating streptococci and some results obtained by its application. *Lancet* ii: 1400-1403.

Graninger W, Ragette R. 1992. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clinical Infectious Diseases.* 15: 49-57.

Gray J, Stewart D, Pedler S. 1991. Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 35:1943-5

Guinane C, Cotter P. 2013. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic advances in gastroenterology.* 6: 295-308.

Guzman A, Schaik W, Rogers M, Coque T, Baquero F, Corander J, Willems R. 2016. Global emergence and dissemination of Enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones?. *Frontiers in Microbiology*. 7: 788.

Hall L, Duke B, Guiney M, Williams R. 1992. Typing of Enterococcus Species by DNA Restriction Fragment Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 915-919.

Haller C, Berthold M, Wobser D, *et al.* 2014. Cell Wall glycolipid mutations and their effects on virulence of *E. faecalis* in a rat model of infective endocarditis. *PLoS One*. 9: e91863.

Hancock L, Gilmore M. 1998. Pathogenicity of Enterococci. In *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., and Rood, J.I. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 251–258.

Handwerger S, Skoble J. 1995. Identification of chromosomal mobile element conferring high level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob ag and chemother.* 39: 2446-2453.

Hayden M. 2000. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Infectious Diseases*. 31: 1058-1065.

Hegstad K, Mikalsen T, Coque T, Werner G, Sundsfjord A. 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 16:541-54.

Hendrickx A, Willems R, Bonten M, Van Schaik W. 2009. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* 17: 423-230.

Hidron A, Edwards J, Patel J, Horan T, Gievert D, Pollock D, *et al.* 2009. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers of Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 29:996-1011.

Higueta N, Huycke M. 2014. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In: S. GM, B. CD, Y.I, eds. Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Jett B, Huycke M, Gilmore M. 1994. Virulence of Enterococci. Clinical microbiology reviews. 7: 462-78.

Johnsen P, Townsend J, Bohn T, Simonsen G, Sundsfjord A, Nielsen K. 2011. Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures. J. Antimicrob Chemother. 66: 608-10.

Johnsen P, Townsend J, Bohn T, Simonsen G, Sundsfjord A, Nielsen K. 2009. Factors affecting the reversal of antimicrobial drug resistance. Lanet Infect Dis. 9:357-64.

Jorgensen J, Turnidge J. 2015. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. Clin Microbiol. 71: 1127-1243.

Kado C, Liu S. 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J. Bacteriol. 145: 1365 – 1373.

Kalina A. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 185-189.

Kieser T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid. 12: 19-36.

Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. 1997. Color Atlas and text book of diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott. pp. 597-600.

Kramer A, Schwebke I, Günter K. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases. 6:130.

Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. Infect. Immun. 60:25-30.

Kuhnen E, Rommelshein K, Andries L. 1987. Combined use of phage typing, enterococcinotyping and species differentiation of group D streptococci as an effective

epidemiological tool. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 266: 586-595.

Lai K, Fontecchio S, KELley A, Melvin Z, Baker S. 1997. The epidemiology of fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. Infection Control and Hospital Epidemiology. 18 : 762-765.

Lebreton F, Willems R, Gilmore M. 2014. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston.

Lee A, White E, Monahan L, Jensen S, Chan R, van Hal J. 2018. Defining the role of the environment in the emergence and persistence of *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) in an intensive care unit: a molecular epidemiological study. Infect Control Hosp Epidemiol. 2018: 1-8.

Levésque S, Dufresne P, Soualhine H, Domingo M, Bekal S, Lefebvre B, Tremblay C. 2015. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. PLoS ONE 10: e0144878.

Liu Y, Cao B, Gu L, Wang H. 2011. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in a Chinese hospital between 2003 and 2009. Microb. Drug. Resist. 17: 449-455.

Livornese L, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, Pitsakis P, Woods G, Kaye D, Levison M, Johnson C. 1992. Hospital-acquired Infection with Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Transmitted by Electronic Thermometers. Ann Intern Med. 117: 112-116.

Lundstrom T, Sobel J. 1995. Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole and Rifampin. Infect Dis Clin. 9: 747-764.

Lundstrom T, Sobel J. 2000. Antibiotics for gram-positive bacterial infections. Infect Dis Clin NA. 14: 463-474.

MacCallum W, Hastings W. 1899. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* with a description of the microorganism. J. Exp. Med. 4: 521-534.

Maki D, Crnich C. 2005. History forgotten is history relived: nosocomial infection control is also essential in the outpatient setting. JAMA Internal Medicine. 165 :2565-2567.

Malone D, Wagner R, Watanakunakorn. 1986. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. The American Journal of Medicine. 81:601-606.

Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I, Sechi L. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. Int J Food Microbiol. 88: 291–304.

Martínez J, Ruthazer R, Hansjosten K, Barefoot L, Snyderman D. 2003. Role of Environmental Contamination as a Risk Factor for Acquisition of vancomycin-resistant Enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. Arch Intern Med. 163: 1905-1912.

Moreno F, Gota P, Crisp C, Magnon K, Melcher G, Jorgensen J, Patterson J. 1995. Clinical and molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a city in southern Texas. Clinical Infectious Diseases. 21: 1234-1237.

Murdoch D, Corey G, Hoen B, Miró J, Fowler V, Bayer A, *et al.* 2009. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21 st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. JAMA Internal Medicine. 169: 463-473.

Murray B. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clinical microbiology reviews. 3: 46-65.

Mutnick A, Biedenbach D, Jones R. 2003. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). Diagn Microbiol Infect Dis 46: 63–68.

Nallapareddy S, Singh K, Sillanpää J, *et al.* 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest.* 116: 2799-807.

Nannini E, Teng F, Singh K, Murray B. 2005. Decreased virulence of *gls24* mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model. *Infect Immun.* 73: 7772-4.

Nelson I, Agudelo H, Mark M. 2014. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment.

Noskin G, Cooper I, Peterson L. 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* sepsis following persistent colonization. *JAMA Internal Medicine.* 155: 1445-1447.

Nowlan S, Deibel H. 1967. Group Q streptococci I. Ecology, serology, physiology and relationship to established enterococci. *J. Bacteriol.* 94: 291-296.

O'Driscoll T, Crank C. 2015. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist.* 8:217-230.

O'Leary W. 1990. Practical handbook of Microbiology. 2 ed. Boca Ratón: CRC Press. P.581.

Ocvirik S, Sava I, Lengfelder I, Lagkouravdos I, Steck N, Roh J, Tchaptchet S, BAo Y, Hansen J, Huebner J, *et al.* 2015. Surface- associated lipoproteins link *Enterococcus faecalis* virulence to colitogenic activity in IL-10- deficient mice independent of their expression levels. *PLoS Pathogens.* 11:e1004911

Orla-Jensen S. 1919. The lactic acid bacteria. *Mem. Acad. Roy. Sci. Danemark. Sect. Sci. Ser. 2* 5:81-197.

Palepou M, Adebisi A, Tremlett C, Jensen L, Woodford N. 1998. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. *J. Antimicrob. Chemot.* 42: 695-612.

Palmer K, Kos V, Gilmore M. 2010. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 632-639.

Panesso D, *et al.* 2010. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. J. Clin. Microbiol. 48: 1562-1569.

Panhan T, Gebieluca A, Lopes I. 2015. Different *vanA* elements in *E. faecalis* and *E. faecium* suggest at least two origins of Tn 1546 among VRE in a Brazilian Hospital. Microbial Drug Resistance. 00: 1-9.

Parenti F. 1986. Structure and mechanism of action of teicoplanin. J. of Hosp Inf. 7: 79-83

Patterson J, Sweeney A, Simms M, Carley N, Mangi R, Sabetta J, *et al.* 1995. An analysis of 100 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. Medicine. 74: 191-200.

Porte L, Hervé B, Prat S, Chanqueo L. 2007. *Enterococcus* sp. Parte I. Rev Chil Infect. 24: 231.

Quiñones D, Marrero D, Falero B, Tamargo I, Llop A, Kobayashi N. 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 60:195-204.

Quintiliani R, Courvalin P. 1994. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. FEMS Microbiol Lett. 119: 359-63.

Ramsey A, Zilberberg M. 2009. Secular trends of hospitalization with vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in the United States, 2000-2006. Infect Control Hosp Epidemiol. 30: 184-186.

Rasmussen R, Karchmer A, Bruun N, Fowler V. 2013. Intravascular infection. In: Engleberg N, DiRita V, Dermody T, eds. Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer. 670-88.

Schielvert P, Chuang-Smith O, Peterson M, Cook L, Dunne G. 2010. *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. PLoS One 5: e13194.

Schleifer K, Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev, as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. And *Enterococcus faecium* comb. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol- 34: 31-34.

Sherman J, Wing H. 1935. An unnoted hemolytic *Streptococcus* associated with milk products. J. Dairy Sci. 18: 656-660.

Sherman. 1937. The streptococci. Bacteriol. Rev. 1: 3-97.

Silva M, Tiago I, Veríssimo A, Boaventura R, Nunes O, Manaia C. 2005. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiology Ecology. 55: 322-329.

Singh K, La Rosa S, Somarjan S, Roh J, Murray B. 2015. The fibronectin-binding EfbA contributes to pathogenesis and protects against infective endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 83: 4487-94.

Singh K, Nallapareddy S, Sillanpää J, Murray B. 2010. Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. PLoS Pathog. 6: e1000716.

Stephenson K, Hoch J. 2002. Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. Pharmacol Ther. 93: 293–305.

Strober W, Fuss I, Mannon P. 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. J Clin Invest. 117:514-21.

T, Sievert D, Pollock D, Fridick S. 2008. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 29:996-1011.

Thurlow L, Thomas V, Narayanan S, Olson S, Fleming S, Hancock L. 2010. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 78: 4936-43.

Top J, Willems R, Van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. 2008. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 46: 214-219.

Umeda A, Garnier F, Courvalin P, Galimand M. 2002. Association between the *vanB2* glycopeptide resistance operon and Tn1549 in enterococci from France. J of Antimicrobiol. Chem. 50: 253-256.

Uttley A, George R, Naidoo J, Woodford N, Johnson A, Collins H, Morrison D, Gilfillan A, Fitch L, Heptonstall J. 1989. High- level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. Epidem. Inf. 103: 173-181.

Van Der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray B, Leclercq R. 1996. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci. The journal of Infectious Diseases. 173:1129-1136.

Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Pasquaroli S, Biavasco F. 2011. Multidrug-Resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-Transfer of Resistance from an *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*. Curr Microbiol. 62: 1438:1447.

Vollar E, Clasener H. Colonization resistance. 1994. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 38: 409-414.

Weiner L, Webb A, Limbago B, Dudeck M, Patel J, Kallen A, Edwards J, Sievert D. 2016. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. Infect Control Hosp Epidemiol. 37: 1288-301.

Weinstein M, Murphy J, Reller L, Lichtenstein K. 1983. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. Rev Infect Dis. 5: 54-70.

Werner G, *et al.* 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill. 13: 19046.

Wilhelm M, Estes L. 1999. Vancomycin. Clin Proc. 74: 928-935.

Williams J, Hergenrother P. 2008. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 12: 389– 399.

Winters M, Schlinke T, Joyce W, Glore S, Huycke M. 1998. Prospective case-cohort study of intestinal colonization with enterococci that produce extracellular superoxide and the risk for colorectal adenomas or cancer. *The American Journal of Gastroenterology.* 93: 2491-2500.

Noble W, Viran  Z, Cree R. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 72: 195-198.

Weigel L, Clewell D, Gill S, Clark N, McDougal L, Flannagan S, Kolonay J, Shetty J, Killgore G, Tenover F. 2003. Genetic Analysis of a high level vancomycin resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 302: 1569- 1571.

Flannagan S, Chow J, Donabedian S, Brown W, Perri M, Zervos M, Ozawa Y, Clewell D. 2003. Plasmid content of a vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. *Antim Ag and Chem.* 47 (12): 3954-3959.

ANEXO I: RECOPIACIÓN DE RESULTADOS POR AISLAMIENTO

Tabla 4. Recopilación de resultados de los aislamientos analizados resistentes a vancomicina.

Cepa	Especie	Área ¹	Especimen ²	Procedencia	Año	Gen de resistencia	Perfil de susceptibilidad ³								Ubicación del gen ⁴			
							VAN	TEI	LIN	LEV	CIP	PEN	AMP	DAP	GEN	EST	CROM	PLASM
10913	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Gdl	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	NS	R	R	Pos	Pos
10984	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
11108	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
11417	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
11500	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
11504	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
11659	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Gdl	11	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
11758	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	Pos	Pos
11834	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
12102	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
12415	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
12480	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
12912	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Gdl	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Nag	Pos
13577	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	12	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
14048	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
14294	<i>E. faecium</i>	Traumatología	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	Pos	Neg
14349	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
14384	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
14412	<i>E. faecium</i>	Urología	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
14460	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	Pos	Pos
14536	<i>E. faecium</i>	MI	Secreción	Gdl	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
14692	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
14738	<i>E. faecium</i>	Traumatología	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Nag	Pos
14830	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
14837	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
13-0049	<i>E. faecium</i>	Neurocirugía	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Nag	Pos
13-0169	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
13-0229	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	MTY	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
13-0353	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Secreción	Gdl	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos

Tabla 4. Recopilación de resultados de los aislamientos analizados resistentes a vancomicina (Continuación).

Cepa	Especie	Área ¹	Especimen ²	Procedencia	Año	Gen de resistencia	Perfil de susceptibilidad ³										Ubicación del gen ⁴	
							VAN	TEI	LIN	LEV	CIP	PEN	AMP	DAP	GEN	EST	CROM	PLASM
13-0507	<i>E. faecium</i>	MI	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
13-0580	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	Pos	Pos
13-0631	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
13-0874	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
13-0956	<i>E. faecium</i>	MI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	NS	R	R	Neg	Pos
13-1484	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Gdl	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
13-1488	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Gdl	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
13-1506	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	Pos	Pos
13-1542	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	Pos	Pos
13-1701	<i>E. faecium</i>	MI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
13-2003	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
13-2130	<i>E. faecium</i>	Traumatología	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	Pos	Pos
13-2379	<i>E. faecium</i>	Consulta	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
13-2380	<i>E. faecium</i>	Consulta	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	NS	R	R	Pos	Pos
13-2381	<i>E. faecium</i>	Consulta	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
13-2631	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
13-2653	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	13	vanA	R	R	S	R	R	R	R	NS	R	R	Pos	Neg
14-0106	<i>E. faecium</i>	MI	Secreción	Mty	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
14-0287	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción	Mty	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
14-0497	<i>E. faecium</i>	UCI	Absceso	Mty	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	Neg	Pos
14-0744	<i>E. faecium</i>	Consulta	Absceso	Mty	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
14-0824	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Absceso	Mty	14	vanA	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	Neg	Pos
14-0850	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Secreción	Mty	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
14-1306	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Secreción	Gdl	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
14-1344	<i>E. faecium</i>	Neurología	Absceso	Mty	14	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	Neg	Pos
15-0508	<i>E. faecium</i>	MI	Tráquea	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
15-1075	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Orina	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
15-1140	<i>E. faecalis</i>	MI	Orina	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
15-1201	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Abdomen	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	Pos	Pos

Tabla 4. Recopilación de resultados de los aislamientos analizados resistentes a vancomicina (Continuación).

Cepa	Especie	Área ¹	Especimen ²	Procedencia	Año	Gen de resistencia	Perfil de susceptibilidad ³										Ubicación del Gen ⁴	
							VAN	TEI	LIN	LEV	CIP	PEN	AMP	DAP	GEN	EST	CROM	PLASM
15-1252	<i>E. faecium</i>	UCI	Cl	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
15-1969	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Sangre	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	NS	S	R	Pos	Pos
15-2496	<i>E. faecium</i>	Gastroenterología	Sangre	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
15-2781	<i>E. faecium</i>	Pediatría	Orina	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
15-3094	<i>E. faecium</i>	MI	Orina	Mty	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Neg	Neg
15-3226	<i>E. faecium</i>	Nefrología	LB	Gdl	15	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
16-0200	<i>E. faecium</i>	Desconocido	Orina	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
16-0483	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Peritoneal	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
16-0536	<i>E. faecium</i>	Pediatría	Orina	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
16-0540	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Abdomen	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
16-0600	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Abdomen	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
16-0818	<i>E. faecium</i>	Desconocido	Orina	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
16-0834	<i>E. faecium</i>	Desconocido	Abdomen	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
16-0897	<i>E. faecium</i>	Pensionistas	Sangre	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	Neg	Neg
16-0992	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Secreción de herida	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
16-1083	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Catéter	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
16-1342	<i>E. faecium</i>	MI	LP	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
16-1331	<i>E. faecium</i>	Desconocido	Orina	Gdl	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
16-1542	<i>E. faecium</i>	Desconocido	Orina	Gdl	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
16-1569	<i>E. faecium</i>	Desconocido	LCR	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
16-1845	<i>E. faecium</i>	Neurología	LCR	Mty	16	vanA	R	R	S	R	R	R	R	NS	R	R	Pos	Pos
17-0003	<i>E. faecium</i>	Unidad HIV	LCR	Gdl	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
17-0188	<i>E. faecium</i>	MI	Orina	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
17-0808	<i>E. faecium</i>	Pensionistas	Orina	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
17-0965	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Tejido	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos
17-0985	<i>E. faecalis</i>	Cirugía	Herida	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Neg
17-1075	<i>E. faecium</i>	Nefrología	Desconocido	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Neg
17-1154	<i>E. faecium</i>	Cirugía	Desbridación de tórax	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Neg
17-1566	<i>E. faecium</i>	MI	LP	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Pos	Pos

Cepa	Especie	Área ¹	Especimen ²	Procedencia	Año	Gen de resistencia	Perfil de susceptibilidad ³										Ubicación del gen ⁴	
							VAN	TEI	LIN	LEV	CIP	PEN	AMP	DAP	GEN	EST	CROM	PLASM
17-1574	<i>E. faecium</i>	Servicios Médicos	Hueso	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	Pos	Pos
17-1750	<i>E. faecium</i>	Desconocido	Orina	Mty	17	vanA	R	S	I	R	R	R	R	S	S	S	Pos	Neg
17-1779	<i>E. faecium</i>	UCI	Secreción bronquial	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	Neg	Pos
17-2057	<i>E. faecalis</i>	Cirugía	Absceso de glúteo	Mty	17	vanA	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	Pos	Pos

¹ UCI: Unidad de cuidados intensivos, **MI**: Medicina interna; ² CI: Colección intra-abdominal, **LB**: Lavado bronquial, **LP**: Líquido pleural, **LCR**: Líquido cefalorraquídeo; ³ **VAN**: Vancomicina, **TEI**: Teicoplanina, **LIN**: Linezolid, **LEV**: Levofloxacino, **CIP**: Ciprofloxacino, **PEN**: Penicilina; **AMP**: Ampicilina, **DAP**: Daptomicina, **GEN**: Gentamicina de alto nivel de resistencia; **EST**: Estreptomina de alto nivel de resistencia, **R**: Resistente, **S**: Susceptible, **NS**: No Susceptible; ⁴ **CROM**: Cromosómico, **PLASM**: Plasmídico, **Pos**: Positivo, **Neg**: Negativo.

ANEXO II: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

✓ **Bromuro de etidio, 0.5 mg/mL (Solución stock).**

Diluir 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

✓ **Bromuro de etidio, 2 µg/mL.**

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock y 249 mL de agua ultrapura). Almacenarse en oscuridad.

✓ **Solución de Kieser 1**

Disolver 10.27 g de sacarosa, 0.394 g de Tris-HCl y 0.931 g de EDTA en agua destilada, ajustar pH a 8.0 y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

✓ **Solución de Kieser 2**

Disolver 1.2 g de NaOH y 2 g de SDS en agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

✓ **TBE 10X.**

Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico y 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

✓ **TE 1X.**

Mezclar 10 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 1 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

✓ **Tris-HCl 500 mM.**

Disolver 30.3 g de Tris-base en 300 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.0 utilizando HCl concentrado y aforar a 500 mL.

✓ **Solución de Anderson 1.**

Disolver 6.7 g de sucrosa, 0.695 g de Tris-base, y 0.29 g de EDTA en agua destilada, ajustar pH a 8.0 y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

✓ **Solución de Anderson 2.**

Disolver 0.01 g de lisozima (10 mg/mL) y 0.03 g de Tris-base en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a un volumen final de 10 mL.

✓ **Solución de Anderson 3.**

Disolver 7.3 g de EDTA y 0.605 g de Tris base en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a un volumen final de 100 mL.

✓ **Solución de Anderson 4.**

Disolver 20 g de SDS, 0.695 g de Tris-base y 0.58 g de EDTA en agua destilada a un volumen final de 100 mL.

✓ **Solución de Anderson 5.**

Disolver 31.52 g de Tris-HCl en agua destilada, ajustar el pH a 7 y aforar a un volumen final de 100 mL.

✓ **Solución de Anderson 6.**

Disolver 0.12 g de Tris-base y 0.029 g de EDTA en agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a un volumen final de 100 mL.